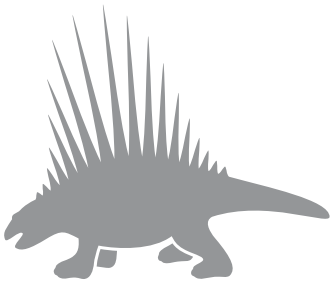


4. KONFERENCE ČESKÉ SPOLEČNOSTI PRO HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRII

Hradec Králové, 15. - 17. dubna 2015

SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ

Sborník příspěvků z 4. konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii

Česká společnost pro hmotnostní spektrometrii
Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany

Olomouc a Hradec Králové 2015

Sborník příspěvků z 4. konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii

Autoři
Kolektiv autorů

Vydáno
Duben 2015, 1. vydání

Vydavatel
Česká společnost pro hmotnostní spektrometrii
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého
17. listopadu 1192/12
771 46 Olomouc
www.czechms.org

ISBN 978-80-905045-4-7

Hlavní sponzoři konference

Česká společnost pro hmotnostní spektrometrii
děkuje následujícím partnerům za významnou podporu

SHIMADZU
Excellence in Science

Shimadzu Handels GmbH,
organizační složka

BRUKER

Bruker s.r.o.

SCIEX

AMEDIS s.r.o.
SCIEX distributor

Thermo
SCIENTIFIC

Thermo Fisher Scientific (Praha) s.r.o.

esf
EVROPSKÁ UNIE
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Další sponzoři

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters

hpst

HPST s.r.o.

have a genius for...
GeneTiCA

GeneTiCA s.r.o.

Akademičtí partneři

Přírodovědecká fakulta,
Univerzita Palackého
Sídlo ČSHS

Fakulta vojenského zdravotnictví,
Univerzita obrany
Spolupořadatel konference ČSHS

MBÚ

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.

4. konference České společnosti pro hmotnostní spektrometrii

Datum konání
15. - 17. dubna 2015

Místo konání
Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany
Třebešská 1575, Hradec Králové, Česká republika

Pořadatelé
Česká společnost pro hmotnostní spektrometrii, Olomouc
Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita Obrany, Hradec Králové

Výbor ČSHS
Předseda: Jana Roithová (Přírodovědecká fakulta, UK Praha)
Místopředseda: Karel Lemr (Přírodovědecká fakulta, UP Olomouc)

Členové:
Petr Man (Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha)
Jan Havliš (Přírodovědecká fakulta, MU Brno)
Petr Novák (Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha)
Patrik Španěl (Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., Praha)
Michael Volný (Ústav aplikované fyziky, UW Seattle)

Místní organizátoři konference
Jiří Stulík (Fakulta vojenského zdravotnictví, UO Hradec Králové)
Pavel Řehulka (Fakulta vojenského zdravotnictví, UO Hradec Králové)
Helena Řehulková (Lékařská fakulta v Hradci Králové, UK Praha)

Program středa 15. dubna 2015

13:00 - 20:00	Registrace
14:40 - 15:00	Zahájení 4. konference ČSHS
	Udělení čestného členství
15:00 - 16:00	**Michael Przybylski** *(University of Konstanz)*
PL-1	*Uncovering molecular details of protein "misfolding - aggregation" using affinity- and ion mobility- mass spectrometry - Physiological and "Parkinson"- Synucleins*
16:00 - 16:20	Přestávka na kávu a čaj
16:20 - 18:20	**I. Hmotnostní spektrometrie v iontové chemii** ***(Předsedající: Jana Roithová)***
16:20 - 17:20	Peter Armentrout *(Detlef Schröder memorial lecture)*
WeO-001	*Thermochemistry of reactions of lanthanide and actinide cations*
17:20 - 17:40	Jozef Lengyel
WeO-002	*Reactivity of sodium with nitrogen-containing mixed ice nanoparticles*
17:40 - 18:00	Patrik Španěl
WeO-003	*Selected ion flow tube mass spectrometry for quantification of volatile carboxylic acids as biomarkers of gastro-esophageal reflux disease, GERD, and esophago-gastric, EG, cancer*
18:00 - 18:20	Jiří Váňa
WeO-004	*MS in the chemistry of CN2 carbene*
18:20 - 18:40	Přestávka na kávu a čaj
18:40 - 19:40	Workshop firmy Bruker
20:00 - 24:00	Párty na uvítanou a sekce plakátových sdělení

Program čtvrtek 16. dubna 2015

09:00 - 10:30 **II. Hmotnostní spektrometrie v biologii**
(Předsedající: Zbyněk Zdráhal)

09:00 - 09:30 Jiří Petrák
ThO-005 *Okusování šneků aneb proteomika membrán*

09:30 - 09:50 Ondrej Šedo
ThO-006 *Využití MALDI-TOF MS profilování nejen v mikrobiologii*

09:50 - 10:10 Jiří Novák
ThO-007 *Software-aided identification of complex nonribosomal peptides from accurate tandem mass spektra*

10:10 - 10:30 Karel Harant
ThO-008 *Porovnání komplexních proteomických vzorků za použití izobarického značení TMT 10plex - detekce reportérových iontů v MS na druhou a v MS3 se synchronní selekcí prekurzorů*

10:30 - 10:50 Přestávka na kávu a čaj

10:50 - 12:20 **III. Hmotnostní spektrometrie v organické analýze**
(Předsedající: Michael Volný)

10:50 - 11:20 Robert Mistrik
ThO-009 *Can quantum chemistry save the mass spectrometry?*

11:20 - 11:40 Josef Cvačka
ThO-010 *Strukturní analýza lipidů novorozeneckého mázku*

11:40 - 12:00 Jan Preisler
ThO-011 *Rychlá zobrazovací hmotnostní spektrometrie MALDI se skenujícím laserovým paprskem*

12:00 - 12:20 Jiří Schulz
ThO-012 *Studium geminálně diaurovaných zlatných komplexů v plynné fázi*

12:30 - 13:30 Workshop firmy Shimadzu

13:30 - 14:30 Oběd

14:30 - 15:40 **IV. Hmotnostní spektrometrie v potravinářství, průmyslu a ochraně prostředí**
(Předsedající: Petr Novák)

14:30 - 15:00 Petr Šimek
ThO-013 *Toward the unattended mass spectrometric analysis: an automated platform for urinary GC-MS and LC-MS based metabolomics*

15:00 - 15:20 Lukáš Krásný
ThO-014 *Identifikace fosforylovaných peptidů pomocí LC-MALDI-TOF/TOF MS spojené s in-situ obohacením na MALDI deskách modifikovaných ambient ion landingem*

15:20 - 15:40 Petr Fryčák
ThO-015 *Screening of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors in herbal dietary supplements of Asian origin*

15:40 - 16:30 Předání ceny Zdeňka Hermana Nadačním fondem Rezonance a přednáška vítězné práce

16:30 - 16:50 Přestávka na kávu a čaj

16:50 - 17:50 Workshop firmy Thermo Fisher Scientific

17:50 - 19:00 Schůze ČSHS

19:00 - 24:00 Večeře a sekce plakátových sdělení

Program pátek 17. dubna 2015

09:00 - 10:30 **V. Hmotnostní spektrometrie v klinické a farmaceutické analýze a metabolomice**
(Předsedající: Jan Preisler)

09:00 - 09:30 Miroslav Ryska
FrO-016 *„Matrix effect" jako nevyhnutelný jev v LC/MS analýze; jak se s ním vyrovnat*

09:30 - 09:50 Zdeněk Spáčil
FrO-017 *Functional assays for lysosomal enzymes and detection of specific disease markers*

09:50 - 10:10 Ondřej Kuda
Fr0-018 *Metabolipidomical profiling of adipose tissue during lipolysis*

10:10 - 10:30 Petr Pompach
FrO-019 *Comprehensive monitoring of glycopeptides alternation in cancer patients by mass spectrometric approach*

10:30 - 10:50 Přestávka na kávu a čaj

10:50 - 11:50 Workshop firmy SCIEX

12:00 - 12:50 **Kevin Schug** *(The University of Texas at Arlington)*
PL-2 *Direct determination of intact proteins using liquid chromatography and multiple reaction monitoring on a triple quadrupole mass spectrometer*

12:50 - 13:00 Závěr konference

13:10 - 14:00 Oběd

PL-1: Uncovering molecular details of protein "misfolding - aggregation" using affinity- and ion mobility- mass spectrometry - Physiological and “Parkinson”- Synucleins

Michael Przybylski [1 *]

1. University of Konstanz

A large variety of cellular processes are based on the formation and dynamics of multi- and supramolecular protein assemblies, and several diseases are characterised by “misfolded” protein aggregates. Mass spectrometry (MS) is often unsuitable to direct analysis of reaction pathways and intermediates in aggregation. Ion mobility- MS (IM-MS) has been emerging as a new tool for analysis of protein aggregation due to its concentration-independent gas phase separation capability. First applications of IM-MS to the in vitro oligomerization of α-synuclein (αSyn) and ß-amyloid (Aß), key proteins for Parkinson’s and Alzheimer’s disease, enabled the identification of hitherto unknown degradation and aggregation products. Time dependent sstudies of the in vitro oligomerization provided first identification of a specific autoproteolytic fragmentation, particularly a highly aggregation-prone fragment by cleavage at V71/T72 in the ß-breaking triplett VVT(70-72) in the central aggregation domain [1].The corresponding recombinant αSyn(72-140) fragment showed substantially faster aggregation and neurotoxicity compared to the intact protein. The recent development of combined bioaffinity-MS methods [2] enabled first direct (top-down) structural studies in vivo. Applications of affinity-MS will be discussed using epitope-specific αSyn- antibodies [3] for the characterization of oligomers and interactions in vivo. Specific mutations of the central (70-72) triplet in synucleins, and affinity-MS provided breakthrough results, e.g. mutation of the VFS(70-72) triplet from physiological ßSyn into αSyn completely abolished neurotoxic aggregation [4]. These results suggest ion mobility-MS as powerful tools for the molecular elucidation of structures and intermediates of polypeptide aggregation.

* Korespondence: Michael.Przybylski@uni-konstanz.de

LITERATURA:

1. Vlad C. et al.: Chem. Biochem. 12, 2740-2744 (2011).
2. Dragusanu M. et al.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 21, 1643-1648 (2010).
3. McLaurin J. et al.: Nature Med. 8, 1263-1269 (2002).

PL-2: Direct determination of intact proteins using liquid chromatography and multiple reaction monitoring on a triple quadrupole mass spectrometer

Kevin A. Schug [1 *]

1. The University of Texas at Arlington

Proteins are essential to life. In recent years, changes in abundances of different proteins have been linked to various disease states as biomarkers. Further, protein therapeutics are becoming increasingly used for treatment of diseases. In both of these cases, efficient and effective methods for protein quantitation from complex biological matrices are desired [1]. Traditionally, protein quantitation has involved protein digestion and determination based on levels of peptide products. Our group has been working to accomplish direct separation and mass spectrometric determination of intact proteins. This has some inherent challenges, including the complexity of the analyte and the low resolution of the triple quadrupole instrument used for multiple reaction monitoring. Even so, with the tuning of some key variables, including collision gas pressure and collision energy, reproducible and intense characteristic fragments for candidate intact protein analytes can be obtained [2]. When coupled with high efficiency separations on next generation stationary phases and on-line sample preparation, the potential for direct quantitation of protein analytes without digestion becomes tractable. This talk will describe the work we have done to date and the questions that still remain unanswered with respect to making such a work-flow common place in the analytical laboratory.

* Korespondence: kschug@uta.edu

LITERATURA:

1. Makawita S. et al.: Clin. Chem. 56, 2212-2222 (2010).
2. Wang E.H. et al.: submitted for publication (2015).

WeO-001: Detlef Schröder memorial lecture: thermochemistry of reactions of lanthanide and actinide cations

Peter B. Armentrout [1 *]

1. The University of Utah

The chemistry of lanthanide and actinide metals is of interest to establish whether f orbitals participate in bonding. Several lanthanides are of interest to the U. S. Air Force because their chemiionization reaction, M + O -> MO+ + e–, is exothermic, potentially providing a means to create enhanced plasma densities in the ionosphere. In our laboratory, reactions of atomic samarium and thorium cations with small molecules have been studied using a guided ion beam tandem mass spectrometer. The kinetic energy dependence of the reactions is analyzed to determine the binding energies of Sm+ and Th+ to ligands such as H, O, N, C, CH, and CH3. The dehydrogenation of methane by Th+ has previously been studied using ion cyclotron resonance mass spectrometry and thought to be exothermic. Our kinetic energy dependent studies show clearly that the reaction forming ThCH2+ exhibits a small barrier. Theoretical studies indicate that the barrier corresponds to the CH bond activation step, rather than the overall reaction enthalpy. This barrier is thought to exist as a result of the mixed (4F,2D) electronic character of the Th+ J = 3/2 ground level combined with extensive spin-orbit effects. The latter must be included for theory and experiment to agree quantitatively. Recent studies of several oxygen donors in our laboratory demonstrate that the bond energy of SmO+ is smaller than in the literature, a result confirmed by independent measurements of the ionization energy of SmO. The revised thermochemistry for oxidation of Sm has direct implications for the Air Force project

* Korespondence: armentrout@chemistry.utah.edu

WeO-002: Reactivity of sodium with nitrogen-containing mixed ice nanoparticles

Jozef Lengyel [1,2 *], Andriy Pysanenko [1], Daniela Šmídová [1,2], Jakub Med [2], Petr Slavíček [2,1], Michal Fárník [1]

1. J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Czech Academy of Sciences
2. Department Physical Chemistry, University of Chemistry and Technology

We have recently implemented several new experimental approaches to build up a versatile apparatus which allows for different experiments with molecular clusters and nanoparticles in molecular beams. Here we concentrate on the experiments with ice nanoparticles doped with atmospherically relevant molecules, e.g., HNO_3, NH_3, NOx, etc. We focused on mass spectrometry implementing different ionization schemes: electron ionization (*EI*) at variable electron energies and special method of electron photodetachment after Na-doping (*NaPI*) to measure fragmentation-free mass spectra [1]. Unique combination of the above mentioned *NaPI* method with *EI* reveals HNO_3 molecules as very effective nuclei for the cluster formation [2]. Besides, our observations suggest that a molecule with some electron affinity such as NOx and HNO_3 reacts with Na via fast charge transfer reaction. This reduction produces the anion of corresponding molecule, which reacts further to yield final products [2,3]. The complex molecular beam experiment was complemented by molecular dynamics simulations.

* Korespondence: jozef.lengyel@jh-inst.cas.cz

LITERATURA:

1. Lengyel J. et al.: Chem. Phys. Lett. 612, 256-261 (2014).
2. Lengyel J. et al.: J. Phys. Chem. Lett. 3(21), 3096-3101 (2012).
3. Šmídová D. et al.: in preparation (2015).

PODĚKOVÁNÍ:

This work was supported by the Czech Science Foundation under project no. 15-12386S.

WeO-003: Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry for quantification of volatile carboxylic acids as biomarkers of gastro-esophageal reflux disease, GERD, and esophago-gastric, EG, cancer.

Patrik Španěl [1 *], Kseniya Dryahina [1]

1. Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i.

Exhaled breath analysis of volatile organic metabolites has great potential in terms of disease diagnosis and measuring physiological response to treatment. Selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS) has been developed for the quantification of metabolites in the exhaled breath.

Of specific interest in clinical diagnostics are currently carboxylic acids and thus a selected ion flow tube, SIFT, study has been carried out of the reactions of H_3O^+, NO^+ and $O_2^{+\bullet}$ with their molecules. The primary products of the H_3O^+ reactions, the protonated molecules MH^+, and the primary products of the NO^+ reactions, nitrosonated (MNO^+) and dehydroxidated $(M–OH)^+$ molecules, were observed to react with the molecules of water by three body association.

The clinical studies involving breath analyses of carboxylic acids include gastro-esophageal reflux disease, GERD, one of the most common causes of chronic cough and esophago-gastric cancer. An in vitro model of GERD based on tissue samples exposed to gastric fluid indicated that acetic acid was increased. Concentration of acetic acid measured by SIFT-MS in breath of 22 GERD patients was found to be significantly higher than that in a control group. Breath acetic acid may be useful for non-invasive diagnostics of GERD.

In another study SIFT-MS has been used to analyse exhaled breath from patients with esophago-gastric cancer, noncancer diseases of the upper gastro-intestinal tract, and a healthy upper gastrointestinal tract cohort. Concentrations of hexanoic acid, phenol, methyl phenol, and ethyl phenol, were found to be significantly different between cancer and positive control groups.

* Korespondence: spanel@jh-inst.cas.cz

LITERATURA:

1. Průhová-Michalčíková and Španěl P.: Int. J. Mass Spectrom. 368, 15-22 (2014).
2. Dryahina K. et al.: J. Breath Res. 8, 037109 (2014).
3. Kumar S. et al.: Anal. Chem. 85, 6121-6128 (2013).

PODĚKOVÁNÍ:

This work was in part funded by the Grant Agency of Czech Republic (Project No. GACR 13-28882S).

WeO-004: MS in the chemistry of CN2 carbene

Jiří Váňa [1 *], Eva Hanzlová [2], Tomáš Martinů [2], Jana Roithová [1]

1. Univerzita Karlova v Praze
2. VŠCHT Praha

The chemistry of carbenes is very important area in the field of nowadays organic chemistry. We focused our attention on the representative of the smallest heterocyclic carbene – diazirinylidene (c-CN2). This could be considered as a very reactive intermediate and after extrusion of nitrogen as a synthetically useful carbon donor. We confirmed existence of this carbene by its capture by methanol with subsequent intramolecular [2 + 1] cycloaddition and by MS study of its formation.

Formation of c-CN2 is proposed via consecutive decomposition of starting 3−halodiazirine-3-carboxylic acids (c-CN2XCOOH, X = Cl or Br). In the first reaction step the acids undergo decarboxylation and form c-CN2X−. This decarboxylation is followed by the loss of X− and formation of c-CN2. For the each reaction step we measured bond dissociation energies on two different instruments (TSQ and LCQ) using two different approaches (Chen´s L-CID and Schröder's calibration). These data were further compared with theoretical calculations. The obtained results were compared to the analogous and well known dihalocarbenes CX2. Finally, the starting material was characterized by IRMPD spectroscopy.

* Korespondence: jirkavopic@seznam.cz

LITERATURA:

1. Hanzlová E. et al.: Org. Lett. 5482−5485 (2014).

PODĚKOVÁNÍ:

Financial support from the European Research Council (StG ISORI, No: 258299) and the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic (Specific University Research Grant MSMT 20/2014) is gratefully acknowledged.

ThO-005: Okusování šneků aneb proteomika membrán

Jiří Petrák [1,2 *], Ondřej Vít [1,2], Petr Man [3,2], Alan Kádek [3,2], Michaela Scigelová [4], Gary Woffendin [5], Eliška Doktorová [1,2]

1. Ústav patologické fyziologie, 1. LF UK, U Nemocnice 5, Praha 2
2. BIOCEV, Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci
3. Mikrobiologický ústav AVČR, Praha
4. Thermo Fisher Scientific, Bremen, Německo
5. Thermo Fisher Scientific, Hemel Hempstead, UK

Membránové proteiny hrají zcela zásadní roli v mnoha buněčných procesech a jsou cíli zhruba poloviny všech schválený léčiv. Přestože jsou transmembránové proteiny kódovány až čtvrtinou lidských genů, jejich hydrofobní charakter a nízká hladina exprese limitují jejich proteomickou analýzu. Bylo vyvinuto množství strategií obohacení membránových proteinů pro proteomické analýzy, spolehlivá a versatilní metoda umožňující proteomickou expresní analýzu membránových proteinů z různých typů buněčných membrán však dosud neexistuje. Přítomnost obou typů úseků – hydrofilních i hydrofobních- ve struktuře transmembránových proteinů brání účinné solubilizaci intaktních proteinů a jejich analytické separaci. Jedním z možných řešení je cílená analýza proteolyticky odštěpených hydrofilních (extramembránových) úseků transmembránových proteinů. I tento přístup však má svá značná omezení. Alternativou zůstává studium hydrofobních peptidů skrytých v buněčných membránách [1]. Tato strategie spočívá v proteolýze všech proteinových složek v biologickém vzorku kromě transmembránových úseků (zpravidla hydrofobních alfa-helixů) chráněných fosfolipidickou dvojvrstvou membrány. Po rozpuštění membrán, chemickém štěpení dlouhých transmembránových úseků pomocí CNBr a po delipidaci lze získané peptidy separovat a analyzovat pomocí LC-MS běžným způsobem. Postup demonstrujeme na lidských lymfomových buňkách, kde jsme uvedeným postupem identifikovali 800 transmembránových proteinů z různých buněčných kompartmentů.

* Korespondence: jpetr@lf1.cuni.cz

LITERATURA:

1. Blackler A.R. et al.: J Proteome Res. 7(7), 3028-34 (2008).

PODĚKOVÁNÍ:

J. Sklenářovi z Sainsbury Laboratory, Norwich, UK za pilotní LC-MS analýzy. J. Pospíšilové a L. Lorkové za přípravu pilotních vzorků. Z. Zdráhalovi z CEITEC za LC-MS analýzu právě probíhajících SILAC experimentů. K. Harantovi za část bioinformatické analýzy. Projekt byl podpořen: GAČR 15-14200S, GA UK 700712 253284, PRVOUK P24/LF1/3, SVV-2013-260033 a Start-up programem BIOCEV (CZ.1.05/1.1.00/02.0109) od ERC.

ThO-006: Využití MALDI-TOF MS profilování nejen v mikrobiologii

Ondrej Šedo [1 *], Zbyněk Zdráhal [1]

1. CEITEC Masarykova univerzita

Během posledních pěti let se instrumentace pro MALDI-TOF MS stala nedílnou součástí klinických laboratoří. Na základě přímé analýzy celých bakteriálních buněk či jejich extraktů jsou touto technikou získávány charakteristické proteinové profily, které slouží k identifikaci bakteriálních patogenů. Základními výhodami metodami jsou její rychlost a diskriminační schopnosti [1].

Vedle klinické diagnostiky nalézá MALDI-TOF MS využití v mikrobiální analýze vzorků i z dalších zdrojů, například v potravinářství. Na základě MALDI-TOF MS profilů je možné identifikovat mikrobiální kontaminaci masných výroků či rozlišit probiotické kmeny laktobacilů [2]. Vedle nesporných výhod však v některých případech diskriminační schopnosti neumožňují rozlišení blízce příbuzných bakteriálních kmenů. Pro tento účel byly vyvinuty dvě varianty standardního protokolu přípravy vzorku, založené na přímé detekci vysokomolekulárních proteinových komponent, či mikrovlnné proteolýze vzorku.

Aplikovatelnost přímé MALDI-TOF MS analýzy však není omezena pouze na mikrobiologii. Přímou analýzou vzorků potravin lze získat informace použitelné pro kontrolu kvality a autenticity výrobků, jak bylo například demonstrováno na příkladu analýzy pivních ležáků [3].

* Korespondence: sedo@post.cz

LITERATURA:

1. Šedo et al.: Mass Spectrom. Rev. 30(3), 417-434 (2011).
2. Šedo et al.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 27(24), 2729-2736 (2013).
3. Šedo et al.: Food Chem. 135(2), 473-478 (2012).

PODĚKOVÁNÍ:

Práce byla uskutečněna v rámci Centrální laboratoře – proteomika za podpory Středoevropského technologického institutu (CEITEC) financovaného z Evropského fondu pro regionální rozvoj (projekt CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

ThO-007: Software-aided identification of complex nonribosomal peptides from accurate tandem mass spectra

Jiří Novák [1 *], Vladimír Havlíček [1]

1. Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.

Nonribosomal peptides (NRPs) have many biological and medical applications. The identification of NRPs by tandem mass spectrometry is a challenging task due to their complex structures. CycloBranch is a tool for *de novo* identification and characterization of linear, cyclic, branched and branch-cyclic NRPs from accurate tandem mass spectra. The tool is based on an annotated database of 287 nonribosomal building blocks in contrast to commonly used *de novo* tools using a restricted database of proteinogenic amino acids. CycloBranch is a stand-alone, cross-platform and open-source application. It has a graphical and user-friendly interface and can be downloaded for free from [1], where the User's manual and video tutorials can be found.

* Korespondence: jiri.novak@biomed.cas.cz

LITERATURA:

1. http://ms.biomed.cas.cz/cyclobranch/
2. Novak J. et al.: submitted (2015).
3. Kavan D. et al.: J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 24, 1177-1184 (2013).

PODĚKOVÁNÍ:

The authors acknowledge the support from the Ministry, Youth and Sports of the Czech Republic (LH14064, LD13038) and Czech Science Foundation (P206/12/1150).

ThO-008: Porovnání komplexních proteomických vzorků za použití izobarického značení TMT 10plex - detekce reportérových iontů v MS na druhou a v MS3se synchronní selekcí prekurzorů

Karel Harant [1 *]

1. Univerzita Karlova v Praze

Porovnání izobarické značky TMT 10plex a Label free kvantifikace MaxQuant LFQ [3]. Použití izobarického značení je dlouho používaná metoda, jejíž největší nedostatek – koizolace prekurzorů – je dobře zdokumentován [2]. Ve srovnání s kvantifikací pomocí Dimethyl nebo SILAC značení bývá popisována jako omezeně použitelná a poskytující horší výsledky [1]. Pro potlačení efektu koizolace prekurzoru se používá kvantifikace reportérových iontů v MS3, kdy se za cenu výrazného snížení počtu identifikovaných a kvantifikovaných proteinů výrazně zlepší kvalita kvantifikace. S Orbitrapem Fusion byla představena komerčně dostupná možnost synchronního výběru prekurzorů a tím zvýšení rychlosti a citlivosti detekce reportérových iontů v MS3. Byl sledován uměle vytvořený vzorek směsi krysího proteomu jako pozadí s klesající koncentrací kvasinkového proteomu. Sledována byla přesnost reportované změny vůči reálnému množství použitého vzorku. Vzorky byly měřeny na stroji Orbitrap Fusion a to před značením pro label free kvantifikaci a po naznačení TMT značkou v MS2 a MS3 módu. Potvrdil se problém spojený s koizolací prekurzoru a jeho odstranění v MS3. Ukázalo se však, že oba módy, MS2 i MS3, správně reportují o nižších poměrech; větší chyba a zplošťování poměrů se začalo objevovat v MS2 až při vyšších rozdílech koncentrací sledovaných proteinů. Také se potvrdilo, že synchronní selekce prekurzoru je schopna částečně kompenzovat úbytek citlivosti metody, ovšem za cenu toho, že je za daný čas změřeno méně spekter oproti MS2 měření. Kvantifikace v MS3 se ukázala jako kvalitativně konkurence schopná alternativa k Label free kvantifikaci. Pomocí obou metod byl dobře určen skutečný poměr proteinů. Pozornost byla rovněž věnována finančním nákladům a hodnocení metod z tohoto úhlu pohledu.

* Korespondence: harant@natur.cuni.cz

LITERATURA:

1. Ting L. et al.: Nat. Methods 8(11), 937-940 (2011).
2. Altelaar A.F. et al. : J. Proteomics 88, 14-26 (2013).
3. Cox J. et al.: Mol. Cell. Proteomics 13(9), 2513-2526 (2014).

PODĚKOVÁNÍ:

Firmě GeneTiCA s.r.o. která věnovala TMT značení použité v těchto experimentech

ThO-009: Can quantum chemistry save the mass spectrometry?

Robert Mistrik [1 *]

1. HighChem

Can quantum chemistry save the mass spectrometry?

* Korespondence: robert.mistrik@highchem.com

ThO-010: Strukturní analýza lipidů novorozeneckého mázku

Josef Cvačka [1 *], Vladimír Vrkoslav [1], Eva Háková [1,2], Lenka Šubčíková [2], Radka Míková [1,2], Michal Hoskovec [1], Richard Plavka [3,4]

1. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.
2. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
3. Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
4. 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy

Lidská kůže se během prenatálního vývoje člověka postupně mění z vrstvy ektodermálních buněk až po několikavrstevnou keratinizovanou tkáň. Postupně se vyvíjí i žlázy, které začínají produkovat kožní maz (sebum). Na těle plodu se z kožního mazu a odloučených kožních buněk vytváří vrstva tzv. novorozeneckého mázku (vernix caseosa). Hlavním úkolem mázku je ochrana plodu před macerací v plodové vodě, spekuluje se však i o řadě dalších funkcí. Začíná se tvořit koncem druhého trimestru těhotenství a bývá přítomen i na kůži novorozenců. Skládá se z vody, lipidů, proteinů a zbytků tkání. Novorozenecký mázek je zajímavý svými unikátními hojivými a antibakteriálními účinky, které mohou být využity v medicíně. Náš výzkum se zaměřuje na detailní charakterizaci lipidů v tomto materiálu.

Lipidy novorozeneckého mázku byly získány extrakcí organickými rozpouštědly a rozděleny pomocí sloupcové chromatografie na několik desítek frakcí. Tyto frakce byly analyzovány chromatografickými a hmotnostně-spektrometrickými metodami. Byla využita GC, HPLC, EI-MS, MALDI-MS, ESI-MS a APCI-MS. Podrobněji jsme se věnovali několika lipidovým třídám. Zajímavé jsou diestery 1,2-diolů (1,2-DDE), které se vyskytují v mázku, ale nejsou produkovány kůží dospělých. 1,2-DDE byly separovány na koloně Nova-Pak C18 s gradientovou elucí v systému acetonitril/ethylacetát. Amonné adukty byly podrobeny vícenásobné kolizně indukované fragmentaci s využitím datově-závislých skenů. Tímto způsobem jsme identifikovali více než dva tisíce 1,2-DDE. V novorozeneckém mázku jsou přítomny i lipidy s dosud neznámou strukturou. Příkladem jsou diestery složené z mastné hydroxykyseliny, mastné kyseliny a cholesterolu. K charakterizaci jejich struktury byla využita vysokorozlišující a tandemová MS.

* Korespondence: cvacka@uochb.cas.cz

PODĚKOVÁNÍ:

Tato práce vznikla za podpory GAČR P206/12/0750 a RVO 61388963.

ThO-011: Rychlá zobrazovací hmotnostní spektrometrie MALDI se skenujícím laserovým paprskem

Jan Preisler [1 *], Antonín Bednařík [1], Pavel Kuba [2], Eugene Moskovets [3]

1. Masarykova univerzita, Brno
2. Vysoké učení technické, Brno
3. MassTech, Inc., MD, USA

Náročné aplikace hmotnostní spektrometrie MALDI, jako jsou zobrazovací hmotnostní spektrometrie (MSI) nebo spojení LC-MS, těží ze zavedení kHz laserů v poslední generaci hmotnostních analyzátorů TOF. I přesto může záznam dat MSI jednoho vysoce rozlišeného obrazu trvat několik hodin. Významným příspěvkem k celkovému času v axiální vakuové MALDI TOF MS s kHz laserem je pohyb terčíku se vzorkem. Naše řešení založené na kombinaci pohybu vzorku a desorpčního laserového paprsku má za následek výrazné snížení celkové doby záznamu.[1]

V laboratoři sestrojený hmotnostní spektrometr TOF je vybaven skenujícím zrcátkem schopným přesměrovat laserový paprsek ve zlomku milisekundy. Jako modelové vzorky jsou použity α-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina a směsi matice a adrenokortikotropního hormonu nanesené pomocí běžné mikropipety, sprejem nebo sublimací.

Budou diskutována celkem tři uspořádání iontového zdroje. V posledním uspořádání ozařuje laserový paprsek terčík pod úhlem 20° (vůči ose letu) a prochází oběma mřížkami iontového zdroje. Extrakční mřížka je upravena s cílem odstranit kolísání signálu během skenu laserového paprsku. Použitím čočky s kratší ohniskovou vzdáleností (75 mm) je na terčíku dosaženo kruhového laserového ohniska o průměru cca 20 μm. Uvedené úpravy nemají vliv na rozlišovací schopnost, hmotnostní kalibraci ani poměr S/N. Snížení doby MSI je nejvíce patrné u malých, vysoce rozlišených obrazů s minimální velikostí laserového profilu a vysokou frekvencí laseru, kdy je možné efektivně využit laserového paprsku v režimu skenování. Například 10 000 pixelový obraz získaný při frekvenci laseru 1 kHz, 20 pulsech na 20 μm pixel a 100 000 bodů na spektrum je zaznamenán během 6 min, více než o řád rychleji než s komerčním přístrojem za stejných podmínek.

* Korespondence: preisler@chemi.muni.cz

LITERATURA:

1. Bednařík A. et al.: J. Anal. Chem. 86, 982-986 (2014).

PODĚKOVÁNÍ:

Děkujeme Grantové agentuře České republiky (15-05387S) a Středoevropskému technologickému institutu – CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

ThO-012: Studium geminálně diaurovaných zlatných komplexů v plynné fázi

Jiří Schulz [1], Elena Shcherbachenko [1], Jana Roithová [1 *]

1. Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 8, 12840 Praha

Geminálně diaurované komplexy jsou organokovové sloučeniny zlata známé již od 70. let minulého století.[1] Základním strukturním motivem těchto látek je třístředová dvouelektronová vazba Au-C-Au. K obnovení zájmu o studium těchto látek přispěl značný rozmach zlatné katalýzy v posledních letech. Geminálně diaurované komplexy byly izolovány jako možné intermediáty několika zlatem katalyzovaných reakcí, přičemž vznik některých reakčních produktů bylo možné vysvětlit pouze na základě vzniku diaurovaných komplexů v určité fázi katalytického cyklu.[2] Možná kooperace dvou zlatných center při aktivaci polynenasycených uhlovodíků vedla k formulaci konceptu duální zlatné katalýzy a ke snaze lépe popsat mechanismus tvorby diaurovaných komplexů, jejich strukturu a také stabilitu.[3]

My jsme se rozhodli zaměřit v rámci svého studia reakčních intermediátů zlatem katalyzovaných reakcí na studium elektronických a sterických vlivů, které ovlivňují stabilitu geminálně diaurovaných komplexů. Diaurované komplexy pro tuto studii byly získány *in-situ* transmetalací arylboronových kyselin na příslušný zlatný prekurzor $Au(L)^+$ (Schéma 1). Provedené CID experimenty ukázaly, že diaurované komplexy fragmentují přednostně odštěpením molekuly arylzlata AuAr (disociační kanál A), a ne jednoduchým štěpením třístředové dvouelektronové vazby Au-C-Au (disociační kanál B). Prahové energie (*AE*) stanovené pomocí CID experimentů v závislosti na použité kolizní energii ukázaly, že elektron-donorové substituenty na arenovém kruhu a elektronově chudé pomocné ligandy L tvoří stabilnější geminálně diaurované komplexy než elektron-akceptorové substituenty a elektronově bohaté ligandy.

* Korespondence: roithova@natur.cuni.cz

LITERATURA:

1. Schmidbaur H. et al.: Chem. Soc. Res. 41, 370-412 (2012).
2. Hashmi A. S. K.: Acc. Chem. Res. 47, 864-876 (2014).
3. Gagné M. et al.: Topp. Curr. Chem., 1-45 (2014).

PODĚKOVÁNÍ:

Tato práce vznikla za podpory grantové agentury European Research Council (projekt ERC-StG-ISORI, PE4).

ThO-013: Toward the Unattended Mass Spectrometric Analysis: An Automated Platform for Urinary GC-MS and LC-MS based Metabolomics

Petr Šimek [1 *], Martin Moos [2], Iva Opekarová [2,3], Helena Zahradníčková [4], Kamil Petrus [5]

1. Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Č. Budějovice
2. Biologické centrum AV ČR, v.v.i.
3. VŠCHT, Praha
4. Biologické centrum AV Čr, v.v.i.
5. Pragolab, s.r.o., Praha

The immense diversity of analytes, their concentrations and ultimately the nature of the solved analytical challenges makes sample preparation a key step of nearly every mass spectrometric analysis. Despite a considerable long-term effort, sample preparation often remains tedious, laborious and an inevitable source of unpredictable human errors that deteriorate the overall analytical performance. Recent technological innovations have brought novel modular solutions that significantly expand the capabilities to adapt to the specific sample preparation method for a fully automated protocol not requiring human intervention.

We have developed an automated sample preparation workflow for profiling of more than 150 protic, mainly amino-carboxylic metabolites in urine. It involves simultaneous metabolite labeling with ethyl chloroformate and liquid liquid microextraction of the treated metabolites into an immiscible organic layer, sample extract transfer into separate vials and subsequent LC-MS and GC-MS analysis.

The unattended sample preparation has been accomplished by means of an in-house workstation called MetaboAuto which has been developed on a modified RTC autosampler corpus (Analytics, Zwingen, Switzerland). An in-house program Robolab was written for the entire workstation control comprising 30 particular operations such as sample aliquot transfer, addition of internal standards, reagents, vortexing, dilution, mixing, withdrawal of an organic layer, exchange and cleaning of syringes followed by injection of the final sample extract into a UHPLC or GC chromatograph. The MetaboAuto exhibits exceptional modularity and can be used either stand-alone or directly build-in on any HPLC-MS or GC-MS instrumentation.

* Korespondence: simek@bclab.eu

PODĚKOVÁNÍ:

The Czech Science Foundation, project No. 13809-S (metabolomics), the Czech Technology Agency, No.TA04011751 (technology).

ThO-014: Identifikace fosforylovaných peptidů pomocí LC-MALDI-TOF/TOF MS spojené s in-situ obohacením na MALDI deskách modifikovaných ambient ion landingem

Lukáš Krásný [1,2 *], Petr Pompach [1,3], Marcela Strnadová [1], Radovan Hynek [2], Karel Vališ [1], Vladimír Havlíček [1,4], Petr Novák [1,3], Michael Volný [5]

1. Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i.
2. Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha
3. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha
4. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Olomouc
5. Applied Physics Laboratory, University of Washington, Seattle, USA

Ačkoliv se hmotnostní spektrometrie uplatňuje ve všech oblastech proteomiky, detekce a analýza fosforylovaných peptidů tímto způsobem je značně limitována. Důvodem je obtížná ionizace fosfopeptidů, která se projeví supresí signálu ve hmotnostním spektru. Obvykle je tento fakt obcházen obohacením fosfopeptidů ve vzorku před vlastní MS analýzou. Ve spojení s hmotnostní spektrometrií MALDI lze využít takzvané *in-situ* techniky, které nabízejí možnost úpravy vzorku přímo na MALDI terči. V porovnání s klasickými chromatografickými postupy dochází k menším ztrátám vzorku způsobené purifikačními mezikroky. V naší laboratoři byla vyvinuta a úspěšně otestována nová technika - tzv. ambient ion landing – pro modifikaci MALDI povrchů oxidy titanu a zirkonu [1]. V této práci představujeme aplikaci modifikovaných povrchů ve spojení s LC-MALDI-TOF/TOF analýzou pro studium složitějších proteinových směsí. Tato aplikace je založena na chromatografickém rozdělení tryptických štěpů proteinů a automatickém nanesení frakcí na připravené povrchy. Celý postup byl interně testován na modelové směsi proteinů a výsledky porovnány se zavedenou technikou obohacení pomocí afinitní chromatografie. Pro demonstraci in-situ techniky v analýze reálných vzorků, bylo provedeno obohacení fosfopeptidů a identifikace příslušných fosfoproteinů i v extrémně komplexní směsi jakou je štěpený celobuněčný lyzát buněk s aktivovanou fosforylační kaskádou. Při porovnání výsledků s afinitní chromatografií byly detekovány odlišné, přesto však biologicky relevantní fosfopeptidy. To naznačuje, že in-situ obohacení je vhodné použít jako paralelní metodu s komplementárními výsledky, přičemž metoda „ambient ion landingu“ nabízí jednoduchý a rychlý způsob přípravy modifikovaných MALDI terčů.

* Korespondence: krasnyl@hotmail.cz

LITERATURA:

1. Krasny L. et al.: J. Mass Spectrom. 47, 1294-1302 (2012).

PODĚKOVÁNÍ:

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou Agenturou ČR (P206/10/P018 and P206/12/1150), Operačním Programem Praha - Koknurenceschopnost (CZ.2.16/3.1.00/24023) a účelovou podporou na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20/2014).

ThO-015: Screening of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors in herbal dietary supplements of Asian origin

Petr Fryčák [1 *]

1. Department of Analytical Chemistry-RCPTM, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

Inhibition of phosphodiesterase type 5 (PDE-5) has been shown to treat erectile dysfunction efficiently. To date, there are seven synthetic PDE-5 inhibitors on the market in at least one country. In addition, many analogues not approved for human were synthesized. These are often added as undeclared components to herbal dietary supplements targeting erectile dysfunction in order to induce the desired effect and make the customer buy the particular supplement again. A significant risk may be, however, associated with using PDE-5 inhibitors that were not approved for human use, especially if the consumer is not aware of their presence in the supplements.

Screening for PDE-5 inhibitors was performed on multiple batches of herbal supplements imported over last five years from Asia. The samples were extracted with methanol and the extracts were analyzed on a UHPLC / high resolution mass spectrometry system. The PDE-5 inhibitors were identified based on accurate mass measurement, isotopic pattern and tandem mass spectra. Many herbal supplements were shown to be adulterated with undeclared PDE-5 inhibitors, both approved (sildenafil) and, most often, not approved for human use (e.g. acetildenafil, chlorodenafil, dichlorodenafil).

* Korespondence: petr.frycak@upol.cz

PODĚKOVÁNÍ:

The support by the Czech Science Foundation (P206/12/1150) is gratefully acknowledged.

FrO-016: "Matrix effect" jako nevyhnutelný jev v LC/MS analýze; jak se s ním vyrovnat?

Miroslav Ryska [1 *]

1. QUINTA-ANALYTICA, s.r.o.

Efekt matrice při LC/MS analýzách je proti klasické jeho definici rozšířen o vliv nečistot či příměsí adsorbovaných v chromatografickém systému či iontovém zdroji. Tyto nečistoty mohou hrát velmi důležitou roli v ionizačních procesech APCI či ESI používaných v LC/MS. Adsorpční vlivy nemohou být jednoduše odstraněny jakýmkoliv čištěním či zdokonalováním chromatografického systému. Použitím izotopicky značených analytů jako vnitřních standardů je však možné negativní dopady těchto jevů při kvantitativním stanovení léčiv a jejich metabolitů v plazmě úspěšně kompenzovat. Ilustrováno je to na příkladu 85 vyvinutých a validovaných metod s různým způsobem zpracování vzorků a s použitím různých způsobů ionizace jak v pozitivním, tak negativním módu. Ilustrována je i možnost pozitivního využití těchto jevů.

* Korespondence: miroslav.ryska@quinta.cz

FrO-017: Inherited metabolic disorders: functional assays for lysosomal enzymes and detection of specific disease markers

Zdeněk Spáčil [1 *]

1. University of Washington

Newborn screening of lysosomal storage disorders (LSDs) is being broadly implemented as new therapies became available and timely initiation of treatment improves outcome. A series of enzyme activity assays based on tandem mass spectrometry has been developed in our lab, greatly outperforming other available tests in terms of performance, simplicity and cost efficiency. We will demonstrate the potential of multiplexed enzyme activity assays coupled with analysis of metabolic markers to reliably screen for Pompe and Fabry diseases, sphingolipid disorders and mucopolysaccharidoses (I; II; IIIA; IVA; VI) in newborn dried blood spots. Several large scale pilot studies based on these assays have been completed or are underway.

* Korespondence: spacilzdenek@gmail.com

FrO-018: Metabolipidomical profiling of adipose tissue during lipolysis

Ondřej Kuda [1 *], Martina Černá [1], Petra Janovská [1], Ivana Brabcová [1], Jan Kopecký [1]

1. Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Introduction: Metabolipidomical analysis of adipose tissue covers measurement of both water-soluble metabolites like Krebs cycle intermediates, and water-insoluble metabolites – bioactive and storage lipids. Our goal is to characterize complex metabolism of adipose tissue – lipolysis pathway - and interaction between adipocytes and macrophages.

Methods: Mature adipocytes were isolated using collagenase from epididymal adipose tissue of adult C57BL/6J mice. Adipocytes were incubated in the presence of RAW 246.7 or bone marrow-derived macrophages (0.2 mil cells and 50 μl of adipocyte suspension). Aliquots of the original tissue, as well as cells and medium after the incubation were stored in liquid nitrogen. Free glycerol and fatty acids were measured in media to estimate a rate of re-esterification. Cell, tissue and media samples were extracted for metabolipidomical profiling – levels of oxylipins and endocannabinoids were measured using RP-LC-MS/MS techniques - profiles of glycerolipids and triacylglycerols, were measured using shotgun lipidomical approach – and Krebs cycle intermediates and nucleotides were measured with HILIC-LC-MS/MS method.

Results: Using this metabolipidomical approach, we were able to detect changes related to altered lipolytical rate. Eicosanoids released from adipose tissue, adipocytes, macrophages or the co-culture after isoproterenol stimulation might serve as adipose tissue-derived signals for other cells in vicinity. Changes in glycerolipid / triacylglycerol profiles illustrate remodeling of acyl chains. Levels of Krebs cycle intermediates as well as energetic equivalents demonstrate the flux and demands for energy during lipolysis/ fatty acid re-esterification.

* Korespondence: ondrej.kuda@fgu.cas.cz

PODĚKOVÁNÍ:

Supported by Czech Science Foundation GP13-04449P and MSMT LH14040

FrO-019: Comprehensive monitoring of glycopeptides alternation in cancer patients by mass spectrometric approach

Petra Darebná [1], Petr Novák [2,1], Radek Kučera [3], Ondřej Topolčan [3], Miloslav Šanda [4], Radoslav Goldman [4], **Petr Pompach** [2,1 *]

1. Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Charles University, Prague, CZ
2. Institute of Microbiology v.v.i., Czech Academy of Sciences, Prague, CZ
3. Department of Nuclear Medicine, Faculty Hospital in Pilsen, Pilsen, CZ
4. Department of Oncology, Georgetown University, Washington, DC, USA

Alternations of proteins glycosylation pattern are usually related with pathophysiological conditions such as cancer. Fucosylated glycans epitopes have been intensively studied as potential biomarkers of different types of diseases. Haptoglobin, an acute phase glycoprotein secreted by liver, is a good candidate for monitoring of liver disease progression. Modern analytical tools and methods, which use combination of liquid chromatography and mass spectrometry, allow precise and sensitive description of these changes. In the presented study we have compared expression levels of selected glycopeptides epitopes in different types of cancers. Mass spectrometric analysis of albumin depleted sera of patients with different types of cancer enabled detection of several glycopeptides and their glycoforms of three proteins including haptoglobin, hemopexin and complement factor H. Differentially fucosylated glycoforms of N-linked glycopeptides were compared with their non-fucosylated forms for each glycoprotein in four types of cancer. On the other hand, analysis of non-treated samples with neuraminidase allowed detection and quantification of multiple sialylated forms of O-linked glycopeptide of hemopexin. The significant increase in fucosylation was observed in patients with hepatocellular carcinoma previously diagnosed with cirrhosis and HCV compared to other cancers. Interestingly, the same situation was observed in doubly sialylated O-linked glycopeptide of hemopexin. The preliminary data indicates that the major glycans alternations are more related to hepatocellular carcinoma caused by HCV infection compared to other cancers.

* Korespondence: pompach@biomed.cas.cz

PODĚKOVÁNÍ:

Acknowledgement: Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (AMVIS Czech Republic-U.S. exchange program LH13051), Project UNCE204025/2012, Operational Program Prague – Competitiveness project CZ.2.16/3.1.00/24023, IMIC institutional research concept RVO61388971 and U01 CA168926, RO1 CA115625, RO1 CA135069.

WeP-001: Typing of *Coxiella burnetii* isolates using mass spectrometry

Gabriela Flores Ramirez [1], Maksym Danchenko [1], Lenka Hernychova [2],
Ľudovít Škultéty [1,3 *]

1. Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Slovak republic
2. Regional Centre for Applied Molecular Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno
3. Institute of Microbiology, The Czech Academy of Sciences, 142 00 Prague, Czech republic

Coxiella burnetii (C. burnetii) is the causative agent of Q fever. The bacterium is highly infectious and is classified as a category B biological weapon. Thus, a rapid and unambiguous identification of *C. burnetii* in naturally occurring Q fever outbreaks, or in cases of a deliberate release of the infectious agent has an utmost importance. In this work, development of an analytical tool for characterization and typing is described. The method starts with an acetonitrile extractions of inactivated *C. burnetii* cells followed by the detection of extracted molecules by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. We have observed noticeable differences in the ion signal profiles of the isolates in the mass range of 3–18 kDa. Many characteristic ions were revieled among the fourteen *C. burnetii* isolates that were characterized. Statistical analysis has resulted in ten unique types that cluster into five different clusters. Thus this result proves that the developed method is highly discriminatory and it represents a promising tool for the characterization of *C. burnetii* isolates in epidemiological studies.

* Korespondence: viruludo@savba.sk

WeP-002: Optimization of sample preparation method for the analysis of protein phosphorylation by MALDI-MS and CZE

Václav Staněk [1 *], Barbora Jankovičová [1], Rudolf Kupčík [1], Aneta Benett [1], Eva Coufalová [1], Zuzana Bílková [1]

1. University of Pardubice

Protein phosphorylation is one of the most abundant post-translational modifications (PTM) affecting many fundamental cellular functions in living organisms. Phosphorylation of serine, threonine and tyrosine is known to have significant influence on signal transduction, metabolic maintenance, gene expression, cell division, cytoskeletal regulation and apoptosis. Protein phosphorylation is also associated with many diseases, including cancer, metabolic disorder, cardiovascular disease and hypertension and Alzheimer's disease.

This work is focused on optimization of sample preparation method for the analysis of phosphopeptides using MALDI LTQ Orbitrap mass spectrometry and capillary zone electrophoresis. All sample preparation steps were tested on bovine α-casein, which was chosen as a model phosphoprotein. Sample of α-casein was digested by the proteolytic enzyme trypsin, immobilized on two different types of magnetic microparticles, macroporous pearl cellulose (Perloza MG) and magnetic silica beads SiMAG-COOH. Phosphopeptides occurring in the peptide sample were enriched using titanium dioxide particles and dephosphorylated by alkaline phosphatase (ALP), immobilized on Perloza MG and SiMAG-NH2 magnetic microparticles. The highest activity of ALP immobilized on SiMAG-NH2 microparticles was achieved in Tris-HCl buffer, while maximal activity of ALP immobilized on Perloza MG microparticles was evaluated using phosphate buffer. All adjustment steps of model sample were verified by MALDI-MS prior to CZE analysis.

* Korespondence: vaclav.stanek@upce.cz

PODĚKOVÁNÍ:

This work was supported by EU project NADINE (No. 246513) and by University of Pardubice (Project SGFChT05/2015).

WeP-003: Photo cross-linking via photo-activable amino acid and mass spectrometry to map protein protein interactions

Renata Ptáčková [1,2 *], Tomáš Ječmen [1,2], Petr Novák [1,2], Radim Osička [1], Miroslav Šulc [1,2]

1. Institute of Microbiology, ASCR, Prague, Czech Republic
2. Department of Biochemistry, Charles University, Prague, Czech Republic

The combination of cross-linking strategy employing protein containing photo-activable amino acid and mass spectrometric analysis enables mapping the interactions within protein complexes in their native states. Presented photo cross-linking approach is based on the substitution of canonical amino acid for its structural analog with photo-reactive functional group (e.g. Met for photo Met) within the sequence of studied protein. The photo initiated reaction is non specific and provides cross-links of zero-length.

In this study the residue-specific incorporation of photo-Met was achieved during recombinant protein expression in bacterial cells. Two proteins were produced to optimize this methodology – human 14-3-3zeta regulatory protein (30 kDa) and important virulence factor of *Bordetella pertussis* CyaA (180 kDa). The rate of photo-Met incorporation was analyzed by MALDI TOF MS after trypsin in-gel digestion. Low level of photo Met incorporation was observed using standard *E. coli* strain. Therefore, auxotrophic *E. coli* strain with blocked biosynthesis of methionine was employed and up to 100% of Met residues were replaced with photo-Met. 14-3-3zeta with incorporated photo Met was successfully purified from bacterial lysate and the homodimeric nature of protein was proved by native electrophoresis. The photo cross-linking reaction was performed and the resulting covalent product was analyzed in bottom-up approach. Novel interaction between two molecules of 14-3-3zeta was identified[1] and thus the successful application of this technique to map protein-protein interactions was demonstrated.

* Korespondence: ptackova.ren@gmail.com

LITERATURA:

1. Ptáčková R. et al.: Int. J. Mol. Sci. 15, 9224-9241 (2014).

PODĚKOVÁNÍ:

The project was supported by Charles University (GAUK903413, UNCE204025/2012) and Grant Agency of the Czech Republic (P207/12/0627).

WeP-004: Characterization of the structure and function of the mouse C-type lectin-like receptor

Lucie Hernychová [1,2 *], Hynek Mrázek [1], Valéria Grobárová [2], Zdeněk Kukačka [1,3], Daniel Kavan [1,3], Ondřej Šebesta [2], Jan Černý [2], Petr Novák [1,3]

1. Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic
2. Department of Cell Biology, Faculty of Science, Charles University
3. Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University

As a part of the innate immunity, NK (Natural Killer) cells provide an early immune response to the different stimuli, e.g., viral infections or tumor growth. Their functions are further complex and include also reproduction, alloimmunity, autoimmunity or allergic diseases. NK cell activities require intricate system of regulation, which is ensured by many different receptors on a cell surface integrating signals from interacting cells and soluble factors. Receptor structure underlies the NK cell biology including ligand binding or subsequent signaling.

This project concerns structure and functional activity of the mouse C-type lectin-like receptor Nkrp1b (Klrb1b) applying advanced mass spectrometric techniques (disulfide bonds characterization, chemical cross-linking and finally design of Nkrp1b models). Also fluorescence microscopy in order to visualize interaction between labeled Nkrp1b protein and murine bone marrow-derived cells was performed. Additional outcome of the project is solving the position and role of the loop and the stalk region on the background of whole protein structure and interaction with its binding partner.

Acquired results show distinct binding properties of several Nkrp1b forms depending on the presence of the stalk region and monomeric/homodimeric conformation. These findings laid the foundation for further studies with aim to clarify whether the Nkrp1 receptors constitute monomers or homodimers on a cell membrane as it has not been directly proved since their discovery in 1970s.

* Korespondence: lucie.hernychova@biomed.cas.cz

WeP-005: Dynamics of chloride channel from *E. coli* studied by hydrogen/deuterium exchange.

Jiří Hausner [1,2 *], Merritt Maduke [3], Petr Novák [1,2], Petr Man [1,2], Daniel Kavan [1,2]

1. Institute of Microbiology, CAS, Prague, CZ
2. Charles University in Prague, CZ
3. Stanford University, Stanford, USA

Chloride channels belong to an extensive family of transmembrane proteins, whose dysfunction causes a wide range of illnesses[1]. A detailed study of the structural changes during transport enables us to understand the transport mechanism and can provide valuable information required for effective treatment.

Considering the fact that mammalian chloride channels are usually produced with some difficulty, experiments are mainly done on bacterial alternatives which have shown to be quite similar to mammalian analogues. Till now the most explored representative is a bacterial chloride channel from *E. coli* (ClC-ec1), whose structure has been solved by X-ray crystallography [2]. This technique as well as electrophysiological measurements have been so far the most widely used methods for studying of chloride channel transport mechanism.

Unlike these methods, hydrogen/deuterium exchange combined with mass spectrometry enables us to monitor dynamic conformation changes under different conditions directly in solution [3]. Our research is focused on the study of structural changes of CLC-EC1 in dependence on protonation (pH 4.5 and 7.5) and the presence of different anions. These anions are more or less suitable substrates for this transporter and therefore help us to reveal the potential transport mechanism of CLC-EC1.

* Korespondence: hausner89@gmail.com

LITERATURA:

1. Chen T.: Annu. Rev. Physiol. 67, 809 (2005).
2. Dutzler R. et al.: Nature 300, 108 (2002).
3. Engen J.R.: Anal. Chem. 81, 7870 (2009).

PODĚKOVÁNÍ:

The work was supported by the grant SVV–2015–389115.

WeP-006: Seeking of cytochrome P450 2B4:b_5 interactions both in cytosol and lipid membrane combining photo-initiated cross-linking by photo-activable amino acid and high resolution mass spectrometry

Tomáš Ječmen [1,2 *], Renata Ptáčková [1,2], Věra Černá [2], Helena Dračínská [2], Petr Pompach [1], Miroslav Šulc [1,2]

1. Institute of Microbiology ASCR, v.v.i.
2. Charles University in Prague

Mixed function oxygenase system participates in organism in detoxication of exogenous substances, drug metabolism, and activation of chemical carcinogens. Structuraly diverse substrates are biotransformed by terminal oxygenases – cytochromes P450 (P450). Catalytic properties of certain P450s (e.g. studied isoforms 2B4) are altered in the presence of cytochrome b_5 (cyb5) – their facultative redox partner. Both cytochromes are anchored in lipid membrane of endoplasmic reticulum by hydrophobic domains whereas their catalytic domains are exposed to cytosol.

Photo-activable methionine analog (pMet) serving as an unselective zero-length cross-linking agent was utilized to covalently fixate individual P450 2B4:cyb5 interactions in an attempt to determine their impact on catalysis. Introduction of pMet to methionine site of protein sequence was realized during recombinant expression in *E. coli* carried out in limit medium supplemented with the unnatural amino acid. Photo-activable cyb5 wild type[1] as well as its 6 mutants each containing single methionine site[2,3] were prepared to probe both interactions in cytosol and within membrane environment. P450 2B4 and a particular photo-activable cyb5 were reconstituted with lipid vesicles mimicking natural membrane and UV-irradiated. Resulting covalent complexes were electrophoretically separated, proteolytically digested and analyzed by LC-ESI-FTICR MS.

The range of amino acids known to participate in binding of P450 2B4 and cyb5 was further extended and yet unexplored interacting regions were identified by this experimental approach. At least two distinct mutual orientations of studied proteins were proposed taking all presented findings into consideration.

* Korespondence: tomas.jecmen@centrum.cz

LITERATURA:

1. Koberova M. et al.: Int. J. Electrochem. Sci. 8, 125-134 (2013).
2. Ječmen T. et al.: Neuro Endocrinol Lett. 35(Suppl2), 114-122 (2014).
3. Ječmen T. et al.: Methods, submitted (2015).

PODĚKOVÁNÍ:

Financial support: GAČR P207/12/0627, UNCE 204025/2012.

WeP-007: Discrimination of sand fly species using protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry

Petr Halada [1,2 *], Daniel Kavan [1,2], Vit Dvorak [2], Kristyna Hlavackova [2], Petr Volf [2]

1. Institute of Microbiology CAS, Prague
2. Faculty of Science, Charles University in Prague

Phlebotomine sand flies are tiny blood-feeding insects and only proven vectors of leishmaniases, a group of important human and animal diseases. Proper identification of sand fly species is essential in understanding leishmania epidemiology, designing surveillance strategies and vector control in endemic areas. Classical species determination relying on morphological keys is often dubious and requires taxonomic expertize. On the other hand, molecular biology-based methods such as DNA sequencing and PCR-based approaches are laborious and rather expensive. As an alternative, protein profiling using MALDI-TOF mass spectrometry has been established as a tool for fast and accurate species identification of various arthropods during last decade.

To evaluate the possible use of MALDI-TOF MS for sand fly species identification we analyzed six laboratory-reared colonies belonging to five different species. After simple protein extraction in 25% formic acid all tested *Phlebotomus* species generated intense and reproducible protein spectra with a high number of species-specific peaks allowing reliable sand fly discrimination. The approach differentiated all but two specimens of *P. sergenti* from laboratory colonies originating from two geographically distant regions (Israel and Turkey). Sex differentiation proved to be less feasible as both male and female individuals of the same species yielded very similar protein profiles with a majority of protein peaks identical to both genders. The possibility to use various sand fly body parts (e.g. legs, wings) for species identification was also examined. Our results suggest that protein profiling by MALDI-TOF MS can serve as a rapid and exact method for the identification of phlebotomine sand flies.

* Korespondence: halada@biomed.cas.cz

LITERATURA:

1. Dvorak V. et al.: Parasites & Vectors 7:21, (2014).

PODĚKOVÁNÍ:

The financial support from Grant Agency of the Czech Republic (GA15-04329S) and from Institute of Microbiology (RVO61388971) is gratefully acknowledged.

WeP-008: Proteomic analysis of dendritic cell signaling events during the first contact with pathogen *Francisella tularensis*

Ivo Fabrik [1 *], Marek Link [1], Pavel Rehulka [1], Jiri Stulik [1]

1. Department of Molecular Pathology and Biology, University of Defence

Francisella tularensis is a highly infectious bacterium responsible for tularemia. It invades and replicates inside host cells and the most virulent strains are able to avoid the induction of adaptive immune response. The most effective adaptive immunity priming cells are dendritic cells (DCs) which present foreign antigens to T-cells. Interestingly, DCs are known to be highly susceptible to *Francisella* invasion. While the mechanisms of *Francisella*-DC interplay are unknown, the outcome of the interaction is significant for the whole organism. The aim of this work was to monitor DC signal transduction during early time points of *Francisella* infection. Bacterial invasion-induced changes in DC proteome of lipid rafts and the whole-cell phosphoproteome were analyzed by the means of global proteomics. Primary bone marrow-derived DCs (BMDCs) were selected as the cell model and the modified protocol of SILAC labeling was used for proteome quantitation. Lipid rafts were isolated as detergent-resistant membranes on sucrose density gradient. For peptide-based analysis of phosphoproteome, whole-cell lysate digests were fractionated on HILIC column on HPLC and collected fractions were then enriched for phosphopeptides using TiO_2 microbeads. Protein/phosphosite identification and quantitation was carried out using LC-MS/MS. In total, more than 1,200 proteins from lipid rafts and 17,000 phosphosites were identified and, in general, changes in phosphoproteome were more pronounced. BMDC proteins affected by *Francisella* invasion were involved in many events of cellular metabolism; e.g. regulation of cytoskeleton or vesicular trafficking. The number of regulated signaling pathways is expected to grow with the deeper data interpretation.

* Korespondence: ivo.fabrik@unob.cz

LITERATURA:

1. Joffre O. et al.: Immunol. Rev. 227, 234–247 (2009).
2. Weintz G. et al.: Mol. Syst. Biol. 6, 371 (2010).
3. Fabrik I. et al.: J. Proteome Res. 13, 752-762 (2014).

PODĚKOVÁNÍ:

The work was supported by a long-term organization development plan 1011.

WeP-009: Electrostatics-driven conformational dynamics of cellobiose dehydrogenase probed by structural mass spectrometry

Alan Kádek [1,2 *], Daniel Kavan [1,2], Roland Ludwig [3], Petr Halada [1], Petr Man [1,2]

1. Institute of Microbiology CAS, Prague, Czech Republic
2. Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic
3. University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria

Being the only currently known extracellular flavocytochrome, cellobiose dehydrogenase (CDH) is an enzyme involved in the oxidation of various polysaccharides, which makes it interesting in the fields of biosensors and biocatalysis. Structurally, it is unique in terms of molecular architecture as it combines two cofactors – haem and FAD – each in one of its two domains. A flexible connection through a polypeptide linker allows the domains to come into close contact necessary for direct electron transfer between the cofactors. To date, structures of the two isolated domains are known, but the dynamics of the whole protein in solution remains poorly described. Therefore, we utilized mass spectrometry to probe the dynamic structural organization of CDH as well as the underlying mechanisms of its functioning.

In the present work we studied pH-induced conformational changes within the CDH molecule as the pH is known to be important for regulating the activity of the enzyme. Additionally, we also focused on the interaction of CDH with calcium cations, which have recently been shown to enable the functioning of CDH at higher pH, where it is otherwise inactive. Using a combination of hydrogen/deuterium exchange MS, intact protein native MS coupled with ion mobility and computational approaches, we gained structural insight into the mechanism of CDH functioning in solution. This we show to be governed by surface electrostatics along the interdomain interface, requiring either protonation or divalent cation-mediated charge bridging to shield patches of negative charge on the protein surface and to enable the two domains to contact closely and exchange electrons.

* Korespondence: kadek@biomed.cas.cz

PODĚKOVÁNÍ:

The project was supported by the Czech Science Foundation (P206/12/0503), European Regional Development Funds (CZ.2.16/3.1.00/24023), the Institute of Microbiology (RVO61388971) and Charles University in Prague (UNCE_204025/2012).

WeP-010: SWATH analysis of interacting proteins of human DNA damage-inducible protein 2 (Ddi2)

Jan Belza [1], **Martin Hubálek** [1 *], Michal Svoboda [1], Klára Šašková [1], Jan Konvalinka [1]

1. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

DNA damage-inducible protein is conserved in all eukaryotic organisms. In yeast the protein is indeed induced by DNA damage, plays role in cell cycle control and exocytosis. It is known to bind ubiquitin and proposed to interact with proteasome subunit RPN10. In human, the domain structure varies slightly and the function of the protein is not known at all. The study of the function involves different approaches including phenotypic experiments with knock-out mice. Presented study describes quantitative mass spectrometric analysis of potential binding partners of human Ddi2. Proteins binding to FLAG-Ddi2 were compared to the control cell lines during affinity purification procedure followed by label free data independent analysis (SWATH)[1]. The measurement was performed on 5600 TripleTOF, analysis in PeakView 2.2 and statistical analysis was carried out in MarkerView. More than 20 proteins have been identified as significantly enriched in Ddi2 expressing cell line. Among those proteins UV excision repair protein RAD23 homolog B and ubiquitin in K-48 linked chain form together with ubiquitinylation evidence of several peptides clearly links the protein into the process of ubiquitin dependent regulatory proteolysis

* Korespondence: hubalek@uochb.cas.cz

LITERATURA:

1. Gillet L.C. et al.: Mol Cell Proteomics. 11(6), O111-016717 (2012).

WeP-011: Uplatnění manuální chromatografické separace permethylovaných N-glykanů přítomných v sérech pacientek s nádorem vaječníků

Martina Zahradníková [1 *], Pavel Řehulka [2], Marek Link [2], Bořivoj Vojtěšek [1], Miloš Vlastislav Novotný [1,3], Lenka Hernychová [1]

1. Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno, ČR
2. Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové, ČR
3. Department of Chemistry, Indiana University, Bloomington, IN, USA

Rakovina vaječníků je druhým nejčastějším onkogynekologickým onemocněním s nejvyšší úmrtností. V současné době léčba onemocnění spočívá v chirurgickém odstranění nádoru, chemoterapii a radioterapii. Při chemoterapii se využívají platinové deriváty, na které často při léčbě vzniká rezistence. Je známo, že glykanové struktury mohou informovat o biologických i biochemických dějích v organizmu a mohou indikovat přítomnost a průběh onemocnění. Lze tedy předpokládat, že změny v glykanových profilech sér odebraných před chemoterapeutickou léčbou by mohly pomoci k predikci rezistence pacientek na tuto léčbu.

Pro experiment bylo použito 2,5 ul séra, ve kterém byly denaturovány proteiny a purifikovány, redukovány a permetylovány glykany. Část vzorku byla měřena bez separace hmotnostním spektrometrem MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems). Druhá část byla separována přes 1 cm kolonku naplněnou reverzní fází (Aeris peptide C18 3,6μm částice) [1]. Jednotlivé frakce byly sbírány na MALDI destičku a po převrstvení matricí měřeny za stejných podmínek. Spektra byla upravena v programu Data Explorer použitím funkcí: Baseline Correction, Noise/Smooth filter a porovnána s databází glykanů[2].

Výsledky měření ukázaly možnost separace permethylovaných glykanů na reverzní fázi. Ve frakcích po manuální chromatografické separaci bylo v hmotnostních spektrech patrné lepší rozdělení a detekován vyšší počet jednotlivých glykanů a dále došlo ke zvýšení intenzit píků v m/z rozsahu nad 3500.

* Korespondence: marti.zahradnikova@gmail.com

LITERATURA:

1. Franc V. et al.: Electrophoresis 34, 2357-2367 (2013).
2. Alley W.R. Jr. el al.: J. Proteome Res. 11(4), 2282-300 (2012).

PODĚKOVÁNÍ:

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpI - RECAMO CZ.1.05/2.1.00/03.0101), státním rozpočtem České republiky (LO1413) a MZ ČR - RVO (MOÚ, 00209805) a IGA NT/13794-4/2012

WeP-012: Analýza zlatých nanočástic metodou SALD ICP MS

Iva Benešová [1], Kristýna Dlabková [1], Tomáš Vaculovič [1,2], Viktor Kanický [1,2 *], Jan Preisler [1,2]

1. Ústav Chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno
2. CEITEC - Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP MS) je unikátní metodou pro analýzu nanočástic poskytující informaci o jejich chemickém složení, koncentraci a, při znalosti tvaru, i o jejich velikosti. Nanočástice jsou do ICP MS typicky zaváděny pomocí nebulizérů. V této práci byly studovány možnosti laserové desorpce za účasti substrátu pro zavádění zlatých nanočástic do plazmatu přímo z vhodného nosiče, plastového terčíku. Experimentální podmínky, mj. hustota zářivého výkonu použitého laseru (Nd:YAG, 213 nm) nebo typ nosného plynu, byly optimalizovány s ohledem na maximální poměr signálu ku šumu jednotlivých signálů nanočástic a zachování maximální transportní účinnosti. Výsledky byly srovnány s analýzou 50-nm zlatých nanočástic s využitím běžného nebulizéru ve spojení s ICP MS.

* Korespondence: viktork@chemi.muni.cz

PODĚKOVÁNÍ:

Za finanční podporu srdečně děkujeme Grantové agentuře České republiky (projekt 15-05387S), projektu CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) a projektu „Zaměstnáním čerstvých absolventů doktorského studia k vědecké excelenci“ (CZ.1.07/2.3.00/30.0009), který je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

WeP-013: Multimodal imaging

Vladimir Havlicek [1 *], Tomas Pluhacek [1], Jiri Novak [1], Andrea Palyzova [1], Oldrich Benada [1], Jaroslav Pol [1], Lukas Krasny [1], Karel Lemr [1], Michael Volny [1], Martin Strohalm [1]

1. Institute of Microbiology ASCR, Prague

In terms of innovation, there is a never-ending hunt for optimal sample preparation steps providing the highest lateral resolution in imaging mass spectrometry (IMS). IMS goes multidimensional and multimodal as recently manifested by foundation of the corresponding research center in Maastricht being supervised by Ron Heeren (NL).

In the first half of this presentation we will disclose the distribution of globotriaosylceramides in Fabry renal murine tissue [1] and dissection of lipid degradation processes in human eye lens [2]. We also will describe the putative surface enhanced mass spectrometry effect we observed on our SolariX FTMS system [3]. In the second part we will present new imaging data we received in mouse and rat models of experimental aspergillosis. On cryosections of Aspergillus-infected mice we will show that unequivocal determination of the components in complex environment is barely possible by using a single imaging technique. The importance of hyperspectral data will be documented on molecular and elemental imaging mass spectrometry, scanning electron microscopy-energy dispersive X-ray and positron emission tomography. Microbial siderophores, important natural iron chelators, have been suggested as emerging infection disease biomarkers in invasive pulmonary aspergillosis and some other infectious diseases. New software tools recently developed in our group for microbiology will also be introduced.

* Korespondence: vlhavlic@biomed.cas.cz

LITERATURA:

1. Kuchar L. et al.: Anal. Bioanal. Chem. 407 (8), 2283-2291 (2015).
2. Pol J. et al.: Eur. J. Mass Spectrom. submitted.
3. Krasny L. et a.: Anal. Bioanal. Chem. 407 (8), 2141-2147 (2015).

PODĚKOVÁNÍ:

The authors acknowledge the major direct support from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (COST-CZ-LD13038 and NPU LO1305). Access to instrumental and other facilities was also supported by EU (COST BM1104, Operational Program Prague – Competitiveness project CZ.2.16/3.1.00/24023) and IMIC institutional research concept RVO61388971.

WeP-014: HPLC separace ve spojení s ESI, MALDI a SALD ICP MS pro analýzu metallothioneinů

Kateřina Jägerová [1], Iva Benešová [1], Kristýna Dlabková [1], Ondřej Polanský [1], Viktor Kanický [1,2], Jan Preisler [1,2] *

1. Masarykova univerzita
2. Středoevropský technologický institut – CEITEC

Metallothioneiny (MT) jsou nízkomolekulární proteiny (6-7 kDa) které jsou díky vysokému obsahu cysteinu schopné vázat velké množství kovů. Hrají důležitou roli v homeostáze, metabolismu a detoxifikaci kovů (Zn, Cu, Cd, Hg) mnoha organizmů. Tato práce je zaměřena na postupnou analýzu eluátu z RP-HPLC kolony třemi komplementárními detekčními technikami: MALDI MS (matrix-assisted laser desorption/ionization), ESI (electrospray ionization) MS a SALD ICP (substrate-assisted laser desorption inductively coupled plasma) MS. Jako modelový systém byl zvolen metallothionein skupiny I (MT1). Po RP-HPLC separaci jednotlivých MT1 forem byl tok vystupující z kolony rozdělen ve spoji T, první část byla vedena on-line do ESI MS, druhá část byla nanesena na MALDI plastový terčík (Prespotted AnchorChip 96). MALDI i SALD ICP MS analýza byla provedena ze stejného terčíku. RP-HPLC separace MT1 komplexů s kovy byla provedena na koloně Vydac 208MS (150 x 4,6mm, 5μm), mobilní fáze (A): 10 mM octan amonný pH 7, mobilní fáze (B): 10 mM octan amonný pH 7 v 50% MeOH (v/v). Gradientová eluce: 0-6 min: 0-20% B; 6 - 14 min: 20-30% B; 14-25 min: 30-60% B. RP-HPLC eluát separovaných forem MT1 byl nanesen na MALDI terčík a následně byl převrstven MALDI matricí (nasycený roztok CHCA 20% ACN (v/v), 1% TFA). Pro stanovení MT1 byla použita multidetekční platforma s ESI, MALDI a SALD ICP MS detekcí. Komerčně dostupný MALDI terčík vyrobený z vodivého plastu byl využit současně pro MALDI a ICP MS analýzu MT. ESI MS poskytuje informaci o komplexech MT a jejich stechiometrii s kovy. Off-line MALDI MS poskytuje doplňující informaci o apoformách (MT bez navázaného kovu) a současně potvrzuje identifikaci forem MT elektrosprejem. SALD ICP MS slouží ke kvantifikaci kovů a ověření stability MT během HPLC separace.

* Korespondence: preisler@chemi.muni.cz

LITERATURA:

1. Mounicou S. et al.: Anal. Chem. 82, 6947–6957 (2010).
2. Tomalová I. et al.: J. Anal. Chem. 8, 6448–6456 (2013).

PODĚKOVÁNÍ:

Děkujeme Grantové agentuře České republiky (15-05387S) a Středoevropskému technologickému institutu – CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

WeP-015: Vývoj metody analýzy HCN v dechu pomoci kombinace termální desorpce (TD) s hmotnostní spektrometrií v proudové trubici s vybranými ionty (SIFT-MS)

Pavel Pásztor [1 *], Patrik Španěl [1], Kseniya Dryahina [1]

1. Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i.

Tato studie je součástí výzkumu neinvazivních metod pro diagnostiku a sledování bakteriální infekce u pacientů s cystickou fibrózou (CF). Cystická fibróza je geneticky podmíněné onemocnění a jeho výskyt v ČR je odhadován na 1:2500 (ročně narozeno 35–45 dětí). Při CF se v dýchacích cestách tvoří abnormálně hustý hlen, který mohou kolonizovat bakterie. Původci infekce dýchacích cest jsou nejčastěji *Pseudomonas aeruginosa (PA), Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia*. Častá a dlouhodobá antibiotická terapie chronické infekce PA může vést ke vzniku rezistence a proto je třeba včasná diagnostika.

Kyanovodík je jedním z možných dechových biomarkerů infekce *P. aeruginosa* [1, 2]. Cílem studie je vývoj metody extrakce těkavých látek včetně HCN z dechu pomocí termálně desorpčních trubiček (TD) pro off-line analýzy pomocí hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty (SIFT-MS). Kvantifikace je založena na chemické ionizaci neutrálních molekul plynného vzorku třemi prekursorovými ionty (H_3O^+, NO^+ nebo O_2^+) během přesně definovaného reakčního času. Poměr výsledných iontových proudů prekursorů a iontů produktu se používá pro kvantifikaci analytů. Hlavní výhodou SIFT-MS je kvantifikace plynné látky v reálném čase, s detekčním limitem 1 ppbv (parts per billion by volume) [3].

Nové zařízení pro termální desorpci (TD) kompatibilní s SIFT-MS bylo vyvinuto na bázi kontrolovaného ohřívání skleněné trubičky se sorbentem, která je zapojena přímo ke vstupu SIFT-MS přístroje zaznamenávajícího časový průběh desorpce. Představeny budou výsledky vývoje metody včetně volby sorbentu, jeho množství a optimalizace teplotního profilu.

* Korespondence: pavel.pasztor@jh-inst.cas.cz

LITERATURA:

1. Shestivska V. et al.: J. Appl. Microbiol. 113, 701-713 (2012).
2. Gilchrist F.J. et al.: European Respiratory Journal 37(2) (2011).
3. Španěl P. et al.: J. Mass Spectrom. 249, 230-239 (2006).

PODĚKOVÁNÍ:

Děkujeme grantové agentuře České republiky (GACR) za finanční podporu projektu GACR 14-14534S.

WeP-016: Mass spectrometry and NMR collaboration in protein structure characterization

Eliška Pospíšilová [1,2 *], Zdeněk Kukačka [1,2], Josef Chmelík [1,2], Daniel Kavan [1,2], Petr Novák [1,2]

1. Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic
2. Institute of Microbiology of the ASCR, v. v. i., Prague, Czech Republic

CD302 is a C-type lectin like receptor expressed on myeloid cells which plays a role in cell adhesion and migration. It was first described as a fusion partner of the CD205 receptor in Hodgkin lymphoma. Since the ligand and proper mechanism of function of CD302 remains unknown we established a method to determine its three-dimensional structure.

The recombinant protein was produced in non-labelled and ^{13}C, ^{15}N labelled media into inclusion bodies. Therefore the protein was isolated, solubilised and refolded. After one step purification it was possible to acquire both mass spectrometry and NMR (if ^{13}C, ^{15}N labelled) data.

The structural mass spectrometry was performed in order to obtain minimal distance restrains. The disulphide bonds analysis and chemical cross-linking experiments were accomplished. The disulphide bonds analysis confirmed the disulphide bonds arrangement which is in agreement with the common C-type lectin fold. The structural information from the chemical cross-linking was acquired on the basis of chemical reaction within the protein using DSS and DSG agents. All the MS structural data were used in structure calculations based on the NMR data which were acquired on the ^{13}C, ^{15}N labelled sample. The suggested structural model was calculated in ARIA/CNS considering MS data, torsion angles (predicted from NMR backbone chemical shift assignment) and restraints gained from the nearly complete (98% of possible) backbone and side-chain resonance assignment.

* Korespondence: eposp@biomed.cas.cz

PODĚKOVÁNÍ:

This work has been financially supported by GAUK 797213, GACR P207/10/1040, CZ. 1.07/2.3.00/20.0055, CZ.2.16/3.1.00/24023 and RVO613889.

WeP-017: Quantitative analysis of a mixture of isomeric ions using helium tagging infrared predissociation spectroscopy

Juraj Jašík [1], Dieter Gerlich [2,1], **Jana Roithová** [1 *]

1. Univerzita Karlova v Praze
2. University Chemnitz, Germany

We will present two methods for separation and assignment of different isomers of helium-tagged dications C6H6++ generated via electron bombardment of either benzene or 1,3-cyclohexadiene. The experiments were performed with our cryogenic ion trap instrument ISORI [2]. Using ISORI, we can measure infrared pre-dissociation spectra of mass-selected ions.

A unique design of our wire quadrupole ion trap allows for a good overlap between a OPO photon beam and a confined ion cloud in the trap. As a result, almost all of the He complexes with a sufficiently large cross section can be photofragmented [3]. This feature enables us to determine not only absorption cross sections but also the composition of the ion mixture quantitatively.

An alternative approach to separate the spectra of the isomers is based on the two-color IR –IR experiment. The ions are exposed to two IR beams with different wavelengths which interact with two different groups of isomers independently. One IR pulse removes a certain number of complexes whereas the other records an IRPD spectrum of the remaining He-tagged ions. Results obtained with both approaches are consistent.

* Korespondence: roithova@natur.cuni.cz

LITERATURA:

1. Jasik J. et al.: J. Am. Chem. Soc. 136, 2960-2962 (2014).
2. Jasik J. et al.: Int. J. Mass Spectrom. 354-355, 204-210 (2013).
3. Jasik J. et al.: J. Am. Chem. Soc. 136, 2960-2962 (2014).

PODĚKOVÁNÍ:

The authors gratefully acknowledge financial support from the European Research Council (StG ISORI, No. 258299).

WeP-018: Analýza malých změn Fc-glykosylace IgG s využitím izotopového značení glykopeptidů

M. Pabst [1], **I. Benešová** [1,2 *], S. R. Fagerer [1], M. Jacobsen [1], K. Eyer [1], G. Schmidt [3], J. Krismer [1], F. Wahl [4], J. Preisler [2], R. Zenobi [1]

1. Department of Chemistry and Applied Biosciences, ETH Zurich
2. Ústav Chemie, Přírodovědecká fakulta MU
3. Department of Biosystems Science and Engineering (D-BSSE), ETH Zurich
4. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Industriestrasse 25, Buchs, Switzerland

Tato práce představuje nový přístup pro profilování Fc-glykosylace IgG založený na značení glykopeptidů stabilními izotopovými značkami. Anhydrid kyseliny sukcinové (SA) byl vybrán jako vhodná značka, protože snadno reaguje s primární aminovou skupinou přítomnou na všech peptidech. Těžká forma ($D_4{}^{13}C_4$) současně poskytuje proti své přirozené lehké formě dostatečný hmotnostní rozdíl (8 Da) pro analýzu celých glykopeptidů jednoduchou MS. Přímočarý protokol pro přípravu vzorků zahrnující tryptické štěpení, značení a extrakci na pevné fázi byl vyvinut a úspěšně použit pro analýzu několika vzorků polyklonálních IgG. Značené glykopeptidy byly analyzovány pomocí MALDI MS a také LC-ESI MS.

* Korespondence: iva.beenesova@gmail.com

PODĚKOVÁNÍ:

Za finanční podporu děkujeme projektům Swiss KTI Grant No. 13123.1 PFNM-NM a projektu „Zaměstnáním čerstvých absolventů doktorského studia k vědecké excelenci“ (CZ. 1.07/2.3.00/30.0009), který je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

WeP-019: Srovnání programů pro analýzu dat z metody vodík/deuteriové výměny ve spojení s hmotnostní spektrometrií: HDX Workbench vs. HDExaminer

Dominika Coufalová [1 *], Bořivoj Vojtěšek [1], Lenka Hernychová [1]

1. RECAMO, Masarykův onkologický ústav, Brno, Žlutý kopec 7, 656 53

Vodík deuteriová (H/D) výměna ve spojení s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením je jedinečnou metodou pro studium proteinových konformací, jejich dynamických změn a protein-proteinových interakcí. Analýza získaných hmotnostních spekter proteinů a peptidů, jejíž cílem je určení míry deuterace, bývá nejdelší a nejpracnější částí celého experimentu. Avšak vzhledem ke vzrůstající popularitě metody H/D výměny stoupá i počet dostupných nástrojů a programů pro zpracování dat, jejichž cílem je analýzu dat usnadnit.

Tato práce byla zaměřena na porovnání dvou programů sloužících k analýze dat z H/D výměny získaných měřením pomocí hmotnostního spektrometru. Srovnávanými programy byly volně dostupný HDX workbench [1] a komerční HDExaminer [2]. Oba programy byly použity na hodnocení dat ze stejného experimentu, ve kterém byl analyzován protein Human Ubiquitin-Conjugating Enzyme (2C4P_A) samostatně a po inkubaci s peptidem proteinu E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2 (Q00987). Vzorky byly měřeny hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific).

Vstupními daty pro oba programy byla změřená LC-MS hmotnostní spektra, aminokyselinové sekvence analyzovaných proteinů a tabulky peptidů s retenčními časy a nábojovými stavy získanými z peptidového mapování (LC-MS/MS). Oba programy byly uživatelsky přívětivé a umožňovaly prohlížení hmotnostních spekter analyzovaných peptidů, posuzování jejich kvality a ověřování správnosti výpočtu procenta deuterace. Nejvýraznějším rozdílem mezi srovnávanými programy byla časová náročnost vyhodnocování experimentů. U HDX workbench byl celkový čas výpočtu několikanásobně delší než u HDExaminer. Navíc HDExaminer nabízí více možností pro export výsledných dat a to i do formátu vhodného pro další zpracování pomocí programu PyMOL.

* Korespondence: dominika.coufalova@mou.cz

LITERATURA:

1. Pascal, B. D. et al.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. 23, 1512–21 (2012).
2. Hamuro, Y. et al.: J. Biomol. Tech. 14, 171–182 (2003).

PODĚKOVÁNÍ:

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpI - RECAMO CZ.1.05/2.1.00/03.0101), státním rozpočtem České republiky (LO1413) a MZ ČR - RVO (MOÚ, 00209805).

WeP-020: Expanding acid protease toolbox for H/D exchange

Ljubina Ivanova [1 *], Alan Kádek [1,2], Martial Rey [3], David C. Schriemer [3], Hynek Mrázek [1], Petr Halada [1], Petr Novák [1,2], Petr Man [1,2]

1. Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic
2. Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague
3. University of Calgary, Calgary

Aspartic proteases working at low pH are used for digestion in hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. Recently described pitcher fluids of *Nepenthes* plants have been shown to efficiently cleave in a pepsin-like manner with additional cleavages after basic residues and proline. In order to reconstitute the *Nepenthes* pitcher fluid proteolytic activity in a defined way, we developed expression protocol for the major protease of the fluid, nepenthesin-1 (Nep-1). The enzyme has unusual pH stability profile, but was shown to be sensitive to reducing and denaturing agents that are often used as additives for digestion of resistant proteins. We have shown that immobilization diminished this drawback and allowed us to use Nep-1 in a challenging HDX project.

Cleavage preferences of Nep-1 reconstituted most of the cleavage pattern described for the pitcher fluid, but the post-proline activity was absent. In a search for this activity we also prepared nepenthesin-2, the second known aspartic protease in the fluid. Compared to Nep-1, recombinant Nep-2 had cleavage preferences identical to Nep-1 but showed very high resistance to denaturing and reducing. However, it lacked the post-proline selectivity as well. We finally ascribed this elusive activity to a new, as yet unknown acid protease, which we have cloned, named as neprosin and whose expression trials are currently underway. Separately or together, nepenthesins and neprosin from pitcher secretions of *Nepenthes* carnivorous plants represent great tools for hydrogen/deuterium exchange and expand the panel of aspartic proteases available.

* Korespondence: ivanova@biomed.cas.cz

PODĚKOVÁNÍ:

Supported by the Czech Science Foundation (P206/12/0503); EU projects CZ. 1.05/1.1.00/02.0109; CZ.2.16/3.1.00/24023 and Charles University (project UNCE 204025/2012).

WeP-021: Využití stanovení a kvantifikace aldehydů v biologickém vzorku jako markeru buněčného poškození železnými nanočásticemi

Jaroslav Semerád [1,2 *], Zdena Křesinová [1], Monika Čvančarová [1], Tomáš Cajthaml [1,3]

1. Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.
2. Klinická a toxikologická analýza, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze
3. Ústav pro životní prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Železné nanomateriály na bázi nulamocného nanoželeza (nZVI) se dnes hojně využívají v sanačních technologiích k dekontaminaci podzemních vod či kontaminovaných ploch. V místech aplikace železných nanomateriálů na vysoce kontaminovaných lokalitách dochází k výraznému snížení celkové toxicity, avšak potenciálně negativní účinek nanomateriálů nebyl doposud dostatečně popsán. Jedinečné vlastnosti nanoželeza znesnadňují použití klasických ekotoxikologických *in vivo* testů při stanovování jeho toxicity.

Tato studie se zabývá novou metodou pro stanovení *in vitro* toxicity materiálů na bázi nZVI, kde je hlavním sledovaným toxickým účinkem míra oxidativního stresu (OS). OS nastává, dojde-li k porušení rovnováhy mezi tvorbou a degradací volných kyslíkových radikálů (ROS). U většiny známých nanomateriálů byla prokázána schopnost tento stres indukovat. V důsledku nadměrné produkce ROS dochází ke zvýšení interakcí s biomolekulami a vzniku nežádoucích, případně toxických produktů – markerů OS. Stanovení míry oxidativního stresu u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, zástupce eukaryotických organismů, je jedním ze slibných testů umožňující stanovení toxicity nanomateriálů na bázi nZVI.

V této studii byly vybrány a sledovány aldehydické frakce - markery peroxidace lipidů vlivem OS indukovaného komerční formou nZVI – NANOFER STAR. Karboxylová skupina aldehydů byla derivatizována pomoci O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)-hydroxylamin hydrochloridu (PFBHA·HCl) a vzniklé deriváty byly následně měřeny pomocí GC-MS. Při expozici kvasinkové kultury železnou nanočásticí NANOFER STAR o koncentracích 0,1 – 10 g/L byl pozorován znatelný nárůst (v koncentraci oproti biotické kontrole) u třech aldehydů a tudíž i toxický účinek železných nanomateriálů.

* Korespondence: Jarda-semerad@seznam.cz

PODĚKOVÁNÍ:

Tento projekt byl realizován za finanční podpory ze státních prostředků prostřednictvím Centra kompetence Technologické agentury ČR č. TE01020218.

WeP-022: Kvantifikace amygdalinu a jeho degradačních produktů pomocí derivatizace v LC-ESI-MS/MS

Miloslav Šulc [1 *], Zora Kotíková [1]

1. Česká zemědělská univerzita

V souvislosti s moderními kulinárními trendy vaření a výživy bez chemie a s rapidním užíváním botanických přípravků (při léčbě rakoviny) [1] dochází zejména v posledních letech k rozšiřování mylných (a vědecky neověřených) informací o biologicky aktivních látkách v rostlinách. Spotřebitelé mohou být tak nevědomě vystaveni působení mnoha škodlivých anebo toxických látek (endogenního nebo exogenního původu). Některé druhy peckovin čeledi Prunus obsahují značné množství amygdalinu. Cílem výzkumného projektu bylo kvantifikovat amygdalin a jeho metabolity v semenech 13 odrůd švestek pěstovaných v České republice, aby bylo možné poskytnout spotřebitelům informaci o jeho koncentraci.

Analyty (amygdalin, mandelonitril a benzaldehyd) byly kvantifikovany [2] po extrakci do methanolu. Benzaldehyd byl derivatizován DNPH (2,4-dinitrofenylhydrazin) [3]. Separace a detekce probíhala na koloně Atlantis T3 (2,1 x 75 mm) v negativním ESI módu (ABSciex, 3200 Qtrap) při použití gradientové eluce 0,1% kyseliny octové ve vodě a 0,1% kyseliny octové v acetonitrilu (Dionex, Ultimate 3000). Výtěžnost metody pro analyty se pohybovala od 89-102 %. Intra-day opakovatelnost byla < 4,3 %. Limit detekce pro amygdalin byl 0,05 μg/ml.

Výsledky ukázaly, že obsah amygdalinu ve švestkách je enormně vysoký (2,08-4,75 g/100 g vyloupaných semen), což je v porovnání s běžnými hodnotami v konzumních mandlích asi 500x vyšší. Metabolity byly přítomny v neporušených semenech v malých množstvích, po jejich rozemletí však obsah během několika dnů stoupal. In-vitro bylo prokázáno, že již po pětiminutovém působení slin na rozemletý vzorek je veškerý amygdalin velmi rychle metabolizován. Vedlejším produktem při in-vitro digesci byl pozorován vznik velmi libé vůně připomínající likér „amaretto“.

* Korespondence: sulcm@af.czu.cz

LITERATURA:

1. Hubner B. et al.: Onkologie 20 (4), 364-370 (2014)
2. Lee J. et al.: J. Agric. and Food Chem., 61 (32), 7754-7759 (2013)
3. Gosetti F. et al.: J. Chromatography A, 1218 (37), 6308-6318 (2011)

PODĚKOVÁNÍ:

Tato práce byla financována z grantu Národní agenturou pro zemědělský výzkum (NAZV) z projektu QI 111B107. Autoři děkují Doc. Ing. Josefu Susovi, CSc. (ČZU Praha) za poskytnutí vzorků.

WeP-023: Proteomické srovnání dřeně zubů moudrosti osob rezistentních vs. náchylných vůči vzniku zubního kazu

Michal Jágr [1 *], Adam Eckhardt [1], Statis Pataridis [1], Lucie Kulhavá [1], Ivan Mikšík [1]

1. Fyziologický Ústav AV ČR, v.v.i.

Zubním kazem trvalého chrupu trpí většina populace vyspělých zemí (přes 90%, ale žijí mezi námi i jedinci vůči vzniku zubního kazu odolní, kterých je ve věku kolem 30-ti let cca 10 % [1]. Příčiny této rezistence nejsou v dnešní době stále plně prozkoumané. Mezi ně může patřit strava, péče o chrup a v neposlední řadě se na ní mohou podílet i genetické faktory, např. imunitní systém jedince a individuální složení slin nebo zubních tkání. Cílem naší studie bylo provést srovnávací proteomickou analýzu zubní dřeně zubů moudrosti dospělých lidí, kteří zubní kaz nikdy neměli a porovnat ji se skupinou lidí, kteří jsou k vytvoření zubního kazu náchylní (3 a více kazů).

K analýze jsme použili dřeň získanou ze zdravých třetích molárů lidí ve věku 17-40 let obojího pohlaví, kteří byli rozděleni do dvou skupin podle rezistence, resp. náchylnosti vůči vzniku zubního kazu. Proteiny ze zubní dřeně jsme extrahovali lyzačním pufrem a směs proteinů analyzovali metodou dvourozměrné gelové elektroforézy [2] nebo metodou diferenční gelové elektroforézy. Výsledné proteinové mapy byly oskenovány a statisticky vyhodnoceny programem PDQuest (Bio-Rad). Spoty vykazující statisticky významné rozdíly mezi oběma skupinami byly z gelu vyříznuty, následně štěpeny trypsinem a výsledné peptidy byly identifikovány nano-kapalinovým chromatografem spojeným s tandemovým hmotnostním analyzátorem s vysokým rozlišením (Q-TOF MaXis).

Identifikovali jsme kvantitativní rozdíly v intenzitě některých spotů mezi oběma skupinami, odpovídající proteinům zastupujícím v buňkách různé funkce, např. peroxiredoxin-1, apolipoprotein A-I, glutathion S-transferasa P, phosphoglycerat kinasa 1 a retinol dehydrogenasa. Tyto proteiny se podílejí na metabolismu buňky, na buněčné komunikaci a přenosu signálu či na transportu.

* Korespondence: jagr@biomed.cas.cz

LITERATURA:

1. Petersen, P.E.: Community Dental Health 22(2), 71-74 (2005).
2. Eckhardt A. et al.: J. Endodont. 40, 1961-1966 (2014).

PODĚKOVÁNÍ:

Tato práce vznikla za podpory grantu Ministerstva zdravotnictví (NT14324-3/2013) a s podporou na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace RVO:67985823.

WeP-024: Chemical cross-linking and hydrogen/deuterium exchange: tools for novel model of human haptoglobin

Zdeněk Kukačka [1,2 *], Daniel Kavan [1,2], Petr Man [1,2], Petr Novák [1,2], Petr Pompach [1,2]

1. Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.
2. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Haptoglobin (Hp) is acute phase plasma glycoprotein that binds hemoglobin (Hb) dimer to extraordinarily strong complex. The forming Hb-Hp complex is subjected to CD163-mediated endocytosis by macrophages and also prevents renal filtration of Hb in kidneys. Although molecular model of human Hp based on the X-ray structure of porcine Hb-Hp complex was described, unfortunately no structure of human Hp has been revealed so far.

In this study we used chemical cross-linking and hydrogen/deuterium exchange for detail structural characterization of human Hb-Hp. Protein samples modified via homobifunctional cross-linking reagents (including their deuterated forms) were analyzed using reverse-phase chromatography coupled to FT-ICR mass spectrometer. The acquired restraints were used to generate a homology model that represents the experimentally determined constraints with a minimum of violations. The hydrogen/deuterium exchange approach was used to monitor the Hp surface which is partially covered by complex glycans. N-linked oligosaccharides were built and attached to the highest ranked model that was refined by molecular dynamics in water. Because of these data, our model represents unique molecular model that combines knowledge of Hp structure from crystal and from solution including complicated glycosylation.

* Korespondence: kukacka@biomed.cas.cz

PODĚKOVÁNÍ:

This work was supported by grants from Grant Agency of the Czech Republic (P207/10/1934), Grant Agency of Charles University (800413), the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (AMVIS LH13051, CZ.1.07/2.3.00/20.0055 and CZ. 1.07/2.3.00/30.0003), and by the Project UNCE204025/2012.

WeP-025: Využití mikro-APPI pro analýzu neutrálních lipidů

Vladimír Vrkoslav [1 *], Miloslav Šulc [2], Josef Cvačka [1]

1. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
2. Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6

Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) [1] je ionizační technika vhodná svým rozsahem molárních hmotností a polarity analytu pro analýzu neutrálních lipidů. Tato technika využívá k ionizaci analytu UV záření. Pokud analyt neabsorbuje energii v oblasti vlnové délky použitého UV záření přímo, je nutné přidávat do mobilní fáze dopant – sloučeninu, která se tímto zářením ionizuje a následnými reakcemi ionizuje analyt. Takovou sloučeninou může být např. toluen, aceton nebo 2-propanol. Při použití komerčně dostupných APPI iontových zdrojů se optimální průtok pohybuje okolo 100ul/min [2]. Využití takto vysokých průtoků ovšem znemožňuje spojení systému s mikro nebo nano-HPLC [3]. Využití nižších průtoků přináší výhody kromě analytického hlediska také z hlediska ekonomického a zdravotních rizik pro operátora.

Byla testována možnost využití APPI v mikroměřítku (mikro-APPI) pro ionizaci neutrálních lipidů. Pro efektivní transport analytu do plynné fáze byl použit odporově vyhřívaný čip obsahující kanálky pro přívod nízkého průtoku mobilní fáze a zmlžovacího plynu [3]. Byly testovány parametry nastavení polohy čipu vůči vstupní kapiláře do hmotnostního spektrometru a teplota vyhřívání čipu. Z testovaných analytů byly technikou mikro-APPI nejefektivněji ionizovány zástupci methylesterů mastných kyselin (methyl laurát) a voskové estery (palmityl oleát). Pro zmíněné analyty byla zjištěna citlivost a lineární dynamický rozsah. Technika byla následně využitá pro přímou analýzu komerční směsi methylesterů mastných kyselin a celkového lipidového extraktu z novorozeneckého mázku.

* Korespondence: vrkoslav@uochb.cas.cz

LITERATURA:

1. Robb D. B. et al.: Anal. Chem. 72 (15), 3653-3659 (2000).
2. Kauppila T. J.et al: J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 16 (8), 1399-1407 (2005).
3. Kauppila T. J. et al: Anal. Chem. 76 (22), 6797-6801 (2004).

PODĚKOVÁNÍ:

Tato práce byla financována z grantu GAČR P206/12/0750 a z projektu RVO 61388963. Autoři děkují skupině Prof. R. Kostiainena (Oddělení farmaceutické chemie, Univerzita Helsinky, Finsko) za poskytnutí vyhřívaného čipu.

WeP-026: Potential of desorption nanoelectrospray in imaging mass spectrometry

Lucie Hartmanová [1 *], Iveta Lorencová [1], Petr Fryčák [1], Hana Chmelíčková [2], Tomáš Ingr [3], Vladimír Havlíček [1], Karel Lemr [1]

1. RCPTM, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, 17. listopadu 12, Olomouc, 771 46
2. Joint Lab. of Optics of Palacký University, 17. listopadu, Olomouc, 771 46
3. Dept. of Exp. Physics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, 17. listopadu 12, Olomouc

Desorption nanoelectrospray ionization (nanoDESI) [1,2] represents a miniaturized version of well-known ambient ionization technique – desorption electrospray ionization (DESI) [3]. For both techniques, work flow typically includes none or only minimal sample preparation. The differences consist in dimension of a spray tip (1-3 μm in nanoDESI, tens μm in DESI), assistance of a nebulizing gas which is considered to be essential for DESI but is not used in nanoDESI.

To evaluate potential of nanoDESI in imaging mass spectrometry, the procedure for preparation of a defined sample pattern on analyzed surface has been suggested and lateral resolution of nanoDESI has been determined. Experiments were carried out using an LCQ Deca ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific, USA) equipped with home-made nanoDESI ion source allowing motorized and controlled movement of a sample. Reproducible sample pattern on glass surface was prepared by coating of microscopic glass by rhodamine B using Spin coater 150 (SPS-Europe B.V., Netherlands). Obtained continuous layer of dye was subjected to a laser beam (Nd:YAG laser 1064 nm) causing dye evaporation. The width of the laser beam was set to 200 μm and various widths of rhodamine B lines were well defined. Three different patterns were finally used in nanoDESI experiments (90, 270 and 781 μm of rhodamine B with the 210, 230 and 219 μm gaps). Line widths were controlled by camera fixed on the laser. Model samples were scanned using three speeds – 5, 25 and 50 μm/s. Signal traces clearly demonstrated the best lateral resolution bellow 90 μm for 5 μm/s. This value was achieved under usual experimental conditions (spray liquid - methanol/water/formic acid 50:48:2 v/v/v), it is more than comparable with DESI.

* Korespondence: lucie.hartmanova@upol.cz

LITERATURA:

1. Ranc, V. et.al.: Chem. Listy 101, 524-529 (2007).
2. Hartmanova, L., et.al.: J. Chromatogr. A 1217, 4223-4228 (2010).
3. Takats, Z., et.al.: Science 306, 471-473 (2004).

PODĚKOVÁNÍ:

The authors gratefully acknowledge the support by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project COST, LD13005).

WeP-027: Screening of new designer drugs

Lucie Borovcová [1 *], Volodymyr Pauk [1], Sandra Benická [1], Vladimír Havlíček [2], Karel Lemr [1]

1. Department of Analytical Chemistry - RCPTM, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc
2. Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Prague 4, Czech Republic

New designer drugs (NDDs) belong to a large group of abused compounds [1,2]. Since many of them have unknown physiological effects they bring a serious health risk. The routine identification of NDDs by well-established GC/MS toxicological methods can be complicated as their mass spectra are mostly missing in databases. Standard screening immunochemical methods may not be available too. Ion mobility-mass spectrometry (IM-MS) and supercritical fluid chromatography-mass spectrometry (SFC-MS) can improve the screening, the diagnosis of intoxication.

Fifteen new designer drugs were measured applying IM-MS and SFC-MS. Experiments were carried out using ESI Synapt G-2s and Acquity UPC^2 coupled to ESI Xevo TQD triple quadrupole (all Waters, UK).

Ion mobility provided very effective suppression of chemical noise. IM-MS identified drugs in spiked urine at low concentration level (ng/ml). Urine samples were diluted by methanol (1:1, v:v), centrifuged, filtrated (PP membrane filter, 0.22 μm), and injected to methanol:water (1:1, v:v, flow-rate 0,25 ml/min). Nevertheless, some isobaric compounds were not separated sufficiently by IM.

NDDs were further studied using SFC-MS. Four stationary phases (Waters Acquity UPC^2 BEH silica, BEH 2-ethylpyridine, CSH Fluoro-Phenyl and HSS C $_{18}$SB, all sub-2 μm particles) and various mobile phases were evaluated. Separation of isobaric compounds and recognition of all studied NDDs was achieved in less than 1.5 minute (BEH silica column, 40 °C, 20 mM NH_4OH in methanol, gradient of methanol in CO_2: 6-24 % in 1.5 min, flow-rate 2.9 ml/min). Both methods offer fast analysis, SFC-MS also successfully discriminates isobaric compounds.

* Korespondence: lucie.borovcova@volny.cz

LITERATURA:

1. McGrane O. et al.: J. Clinic. Toxicol. 1, 108 (2011).
2. Airuehia E. et al.: J. Clinic. Toxicol. 2, 125 (2012).

PODĚKOVÁNÍ:

The authors gratefully acknowledge the support of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Kontakt LH14064) and Palacký University (IGA_PrF_2015_020).

WeP-028: Multidimenzionální chromatografická analýza intaktních lipidů novorozeneckého mázku

Eva Háková [1,2 *], Radka Míková [1], Vladimír Vrkoslav [2], Richard Plavka [3], Josef Cvačka [2]

1. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 2030/8, 128 43 Praha 2
2. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
3. Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK a VFN v Praze, Apolinářská 18, 128 08 Praha 2

Novorozenecký mázek (vernix caseosa, VC) je bílá sýrovitá hmota, která se začíná tvořit na povrchu kůže plodu ve třetím trimestru těhotenství. Tento biologický materiál je tvořen převážně vodou (80 %) a zbylou část reprezentují lipidy (10 %) a proteiny (10%). VC má řadu ne zcela objasněných funkcí, hlavně kvůli nedostatečné znalosti jeho lipidového a proteinového složení, což je zapříčiněno velkou komplexitou materiálu. Má ale potenciál být využit v medicíně díky svým hojivým a antibakteriálním účinkům [1,2].

Cílem této práce bylo vyvinout multidimenzionální separační metodu pro analýzu intaktních lipidů obsažených ve VC. Zaměřili jsme se na lipidy, které by mohly patřit do třídy ceramidů. Ve VC se vyskytuje řada ceramidů, ale ne všechny byly zcela popsány.

Jejich detailní analýzy proběhly na úrovni složení mastných kyselin [3]. Vlastní experimentální práce zahrnovala separaci lipidového extraktu kolonovou chromatografií se silikagelem, kdy bylo získáno 30 frakcí, převážně nepolárních lipidů. Získané frakce byly podrobeny přímé analýze pomocí vysokorozlišujícího hmotnostního spektrometru. Vybraná frakce, č. 23 byla dále analyzována NP-HPLC/APCI-MS/MS pro detailnější oddělení tříd lipidů přítomných ve zkoumané frakci. Bylo zjištěno, že tato frakce mimo jiné obsahuje lipidy se sumárním vzorcem $C_xH_yO_4N$. Preparativní chromatografií byla získána subfrakce pro další experimenty. Z RP-HPLC/APCI-MS/MS analýz této subtrakce bylo možné určit neutrální ztráty protonované molekuly a usuzovat tak na možné struktury ceramidů. Fragmentační spektra ale jednoznačně neobjasnila o jaký typ ceramidů se jedná. Proto byla rovněž provedena derivatizace těchto lipidů, která umožnila detailní pohled na složení mastných kyselin ve zkoumaných lipidech.

* Korespondence: hakova@uochb.cas.cz

LITERATURA:

1. Hoath S. et al.: New York: Marcel Dekker (2003).
2. Singh G. et al.: Indian J Dermatol 53(2), 54–60 (2008).
3. Oku H. et al.: Lipids 35(4), 373-381 (2000).

PODĚKOVÁNÍ:

Tato práce byla financována z projektu GAČR (P206/12/0750) a Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV260205).

WeP-029: Spojení tenkovrstvé chromatografie s DLTV ICP MS pro speciaci selenu

Antonín Bednařík [1 *], Viktor Kanický [1,2], Jan Preisler [1,2]

1. Masarykova univerzita
2. CEITEC - Central European Institute of Technology

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP MS) je technika pro ultrastopovou elementární analýzu. Pro speciaci je nutné předřadit před ICP MS separační krok, tradičně kapalinovou chromatografii (HPLC) či kapilární elektroforézu (CE).

Tepelné odpařování diodovým laserem (DLTV) je technika zavádění vzorků pro ICP MS, využívající diodového laseru ke generování aerosolu ze substrátu. Substrátem je filtrační papír nebo desky pro tenkovrstvou chromatografii (TLC). Substrát je přetištěn černým inkoustem, který slouží jako absorbér záření. Po ozáření přetištěného substrátu laserem dochází k pyrolýze a vzniklý aerosol je unášen nosným plynem do plazmatu. DLTV ICP MS jsme dříve využili pro analýzu kapalných vzorků, včetně neupravené krve, ve formě vyschlých kapek [1,2] a spojení TLC – DLTV ICP MS jsme demonstrovali na analýze kobalaminů.[3]

V tomto příspěvku bude diskutováno využití DLTV ICP MS jako citlivé detekční techniky pro TLC vybraných specií selenu (selenocystin, selenomethionin, methylselenocystein, seleničitan, selenan a kyselina methylseleničitá). Separace specií selenu byla provedena na celulózových a silikagelových TLC deskách. TLC desky byly vyvíjeny směsí isopropanol : voda : chloroform. Po vysušení byly středy separačních kanálků přetištěny 1,5 mm širokou linií černého inkoustu a nastříhány na proužky. Ty byly vloženy do trubicové DLTV cely a skenovány pomocí diodového laseru (1,2 W; 808 nm). Na celulózových deskách byly rozděleny 4 z 6 zkoumaných specií, na silikagelových deskách pak 5 z 6 specií. V příspěvku bude také diskutován mechanismus DLTV ze silikagelového nosiče užitého pro DLTV vůbec poprvé. Závěrem je spojení TLC – DLTV ICP MS představeno jako jednoduchá, levná a rychlá alternativa k HPLC – ICP MS pro speciaci selenu.

* Korespondence: buhbedna@gmail.com

LITERATURA:

1. Foltýnová P. et al.: Anal. Chem. 84, 2268 (2012).
2. Foltýnová P. et al.: J. Anal. At. Spectrom. (2014).
3. Bednařík A. et al.: J. Chrom. A 1364, 271 (2014).

PODĚKOVÁNÍ:

Děkujeme za finanční podporu Grantové agentuře České republiky (15-05387S) a projektu CEITEC – „Central European Institute of Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z Evropského fondu pro regionální rozvoj.

WeP-030: Stanovení polychlorovaných bifenylů v podzemní vodě a v pevných matricích prostřednictvím GC/MS

Kamila Šrédlová [1,2 *], Zdena Křesinová [1], Monika Čvančarová [1], Tomáš Cajthaml [1,2]

1. Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.
2. Ústav pro Životní prostředí PřF UK v Praze

Polychlorované bifenyly (PCB) jsou významné polutanty, které velmi pomalu podléhají degradaci a v životním prostředí přetrvávají dlouhou dobu. PCB mají mnohé negativní účinky na životní prostředí, organismy i lidské zdraví.

Pro stanovení PCB v dlouhodobě kontaminované podzemní vodě z areálu bývalé obalovny živičné drti byla optimalizována metoda extrakce pevnou fází (SPE) s následnou GC/MS analýzou. Průměrná výtěžnost SPE demineralizované vody uměle kontaminované PCB byla 86 ± 12 %. V podzemní vodě byla zjištěna koncentrace PCB 3,3 ± 0,1 $\mu g \cdot l^{-1}$ (suma vybraných kongenerů). Nejhojněji zastoupené byly trichlorované kongenery, které dohromady představovaly asi 80 % celkového obsahu PCB.

Vytvořená metodika byla dále použita pro zhodnocení degradačního potenciálu kmene *Pleurotus ostreatus* vůči vybraným zástupcům PCB při jejich odstraňovaní z uměle kontaminované vody v pilotních experimentech. U kmene *P. ostreatus* byla popsána vysoká degradační účinnost vůči některým organopolutantům, včetně některých kongenerů PCB. Vzhledem k faktu, že *P. ostreatus* je řazen mezi houby bílé hniloby, byl jako nosič pro náplňové reaktory zvolen slámový substrát, ve kterém byla rovněž analyzována reziduální koncentrace PCB. Pro tuto analýzu byla optimalizována vysokotlaká extrakce rozpouštědlem pro pevné matrice (ASE) s následnou GC/MS analýzou. Průměrná výtěžnost ASE aplikované na slámový substrát uměle kontaminovaný PCB byla 86 ± 17 %. *P. ostreatus* byl při degradaci Deloru 103 schopen z počátečního obsahu 50 μg po čtyřech týdnech odstranit 44 ± 2 % PCB.

Následně budou obě metodiky (SPE a ASE) využity pro zhodnocení degradace PCB v uměle i přirozeně kontaminované vodě při experimentech zahrnujících vsádkové laboratorní a poloprovozní bioreaktory.

* Korespondence: kamila.sredlova@natur.cuni.cz

PODĚKOVÁNÍ:

Tento projekt byl realizován za finanční podpory ze státních prostředků prostřednictvím Centra kompetence Technologické agentury ČR č. TE01020218.

WeP-031: Purifikace a charakterizace enzymů kmenů *Pleurotus ostreatus* pro degradaci 17α-ethynylestradiolu

Lucie Munzarová [1,2 *], Lucie Linhartová [1], Petr Halada [1], Zdena Křesinová [1], Tomáš Cajthaml [1,3]

1. Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i.
2. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
3. Ústav pro Životní prostředí PřF UK v Praze

Práce je zaměřena na purifikaci a identifikaci enzymů produkovaných třemi ligninolytickými houbovými kmeny *Pleurotus ostreatus* (Kryos, HK a 3004) a jejich participaci při degradaci 17α-ethynylestradiolu (EE2). EE2 je pro svou vysokou biologickou aktivitu hojně využíván jako aktivní složka perorální antikoncepce. V životním prostředí je však vysoce perzistentní a svými vlastnostmi je řazen mezi skupinu organopolutantů negativně působících na hormonální soustavu - tzv. endokrinní disruptory.

Detailní studium degradace EE2 u kmenů *P. ostreatus* bylo provedeno řadou experimentů zahrnujících identifikaci a purifikaci příslušných enzymů či jejich proteoforem prostřednictvím elektroforetických, chromatografických a hmotnostně spektrometrických metod. Prostřednictvím hmotnostní analýzy MALDI-TOF a srovnáním sekvencí s veřejně dostupnými proteomickými databázemi byly v houbových kulturách charakterizovány enzymy bilirubin oxidasa, fosfatidylserin dekarboxylasa, tripeptidyl peptidasa A a versatilní peroxidasa.

Degradační potenciál byl stanoven sadou *in vivo* a *in vitro* pokusů s houbovými frakcemi. Z pilotních experimentů vyplývá, že všechny studované kmeny *P. ostreatus* jsou schopny za podmínek *in vivo* degradovat EE2 v průběhu prvních 3 dnů kultivace, avšak s rozdílnou detekovanou aktivitou studovaných extracelulárních enzymů. Při *in vitro* experimentech byly detekovány významné rozdíly při degradaci prostřednictvím enzymu mangan-dependentní peroxidasy. Studium dalších houbových enzymatických aparátů a srovnání vlivu podmínek na hladinu aktivit enzymů je předmětem současného výzkumu. Výsledky práce budou použity v dalších biotechnologických experimentech s purifikovanými enzymy pro degradace endokrinních disruptorů.

* Korespondence: yni.luci@centrum.cz

PODĚKOVÁNÍ:

Tento projekt byl realizován za finanční podpory ze státních prostředků prostřednictvím Centra kompetence Technologické agentury ČR č. TE01020218.

WeP-032: The use of spectral trees as a novel approach in identification of adenosine deaminase deficiency metabolites in human urine

Lukáš Najdekr [1,2 *], Kateřina Mičová [1,2], Lucie Mádrová [1], David Friedecký [1,2], Jitka Široká [1], Tomáš Adam [1,2]

1. Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacký University in Olomouc
2. Department of Clinical Biochemistry, University Hospital in Olomouc, Olomouc

Adenosine deaminase deficiency (ADA) belongs to the various group of inborn errors of purine metabolism. These diseases express large variety of neurological, immunological, heamatological and renal manifestations. Accumulation of toxic intermediates or depletion of nucleotides deepen the disorders' pathogenesis. Most of the defects are inherited in an autosomal recessive manner [1].

Based on our preliminary studies on capillary electrophoresis with UV detection, many purine metabolites were found. Nevertheless, no sufficient identification tool was available. This was overcome by novel approach of spectral trees, which uses multistage fragmentation to identify different metabolic modifications. This approach allows us to see the unmodified structure of the metabolite at lower MSn level and by "bottom-up" strategy get the individual metabolic modification. Data were acquired using untargeted metabolomics approach by UHPLC coupled with high resolution tandem mass spectrometer Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, USA). Data were evaluated by recently introduced software Compound Discoverer 1.0.0.692 (Thermo Fisher Scientific, USA) and statistically processed using R software.

Number of potential metabolites of adenosine, inosine and deoxyadenosine found by Compound Discoverer was 36. Most frequent metabolic transformations were methylation, oxidative deamination and desaturation. All metabolites were acquired with mass error less than 0.5 ppm. For comparison four ADA patient samples and twenty healthy volunteers were used. By using the approach of spectral trees metabolites were successfully confirmed. In the future this method can represent significant tool for identification of metabolites with potential diagnostics importance.

* Korespondence: lukas.najdekr@gmail.com

LITERATURA:

1. Balasubramaniam S. et al.: J. Inherit. Metab. Dis. 37, 669-686 (2014).

PODĚKOVÁNÍ:

This project was supported by NPU I (LO1304) and Czech Science Foundation Grant I 1910-N26.

WeP-033: Detailed study of imatinib metabolization using high−resolution mass spectrometry

Kateřina Mičová [1,2 *], David Friedecký [1,2], Edgar Faber [3], Marcela Hrdá [1], Tomáš Adam [1,4]

1. Institute of Molecular and Translational Medicine, in Olomouc
2. Laboratory for Inherited Metabolic Disorders, in Olomouc
3. Department of Hemato-Oncology, Palacky University in Olomouc
4. Department of Clinical Chemistry, University Hospital Olomouc

Therapeutic drug monitoring is widely applied useful tool for treatment individualization in order to achieve optimal clinical response and avoid toxicity. Due to drug metabolizing enzymes several bioactive or toxic metabolites are produced. Therefore determination of parent drug and also of metabolites may have clinical relevance and could be helpful for treatment adjustment. The aim of the work was to assess a detailed profile of imatinib (IM) metabolites in plasma of patients with chronic myeloid leukemia. Plasma proteins were precipitated by methanol and supernatant was used for analysis. Separation proceeded on Phenomenex Kinetex C18 column (100 x 2.1 mm; 1.7 μm) using UltiMate 3000 RS liquid chromatography with mass spectrometry detection using Orbitrap Elite instrument (Thermo Scientific) based on exact mass measurement. Scan range of m/z 350 – 1200 was chosen and the resolution was set at 60,000 FWHM. All measurements were performed with mass accuracy $<$ 5 ppm. Data were evaluated using Excalibur 2.2 SP1, MetWorks 1.3 SP3 and Mass Frontier 7.0 software. In plasma samples 90 metabolites in concentration range of 0.1 nmol/L - 1 μmol/L were found. For confirmation of metabolite identities characterized by m/z values, MS2 exact mass fragmentation of phase I metabolites and MS3 fragmentation of phase II metabolites (conjugates) in orbitrap mass analyser were performed. Some differences in profiles of oxidation and dioxidation were observed between patients. New generation of high resolution mass spectrometry offers sensitive tool for detail study of drug metabolism in biofluids. IM is transformed to several metabolites that could serve as useful diagnostic tool. Further studies should be focused on elucidation of clinical significance of newly discovered metabolites.

* Korespondence: KaterinaMicova@gmail.com

PODĚKOVÁNÍ:

The work was supported by a grant of the IGA Ministry of Health, Czech Republic NT12218-4/2011 and Ministry of Education, Youth and Sports MSMT-7778/2014 (LO1304 - Support of suistainability of the Institute of Molecular and Translational Medicine).

WeP-034: Ultra-fast online SPE-MS/MS method for quantification of four tyrosine kinase inhibitors in human plasma

Ivo Vrobel [1,2 *], Kateřina Mičová [1,2], Jitka Široká [1], David Friedecký [1,3], Edgar Faber [4], Tomáš Adam [2,3]

1. Institute of Molecular and Translational Medicine, UP, Olomouc, Czech Republic
2. Department of Clinical Biochemistry, University Hospital, Olomouc, Czech Republic
3. Laboratory of Inherited Metabolic Disorders, University Hospital, Olomouc, Czech Republic
4. Hematooncology clinic, University Hospital, Olomouc, Czech Republic

Tyrosine-kinase inhibitors (TKIs) are class of anti-cancer drugs used to treat various forms of blood cancers or solid tumors. We assessed the performance of an ultra-fast online SPE-MS/MS system (RapidFire) to analyze four TKIs, Imatinib (IMA), Dasatinib (DAS), Nilotinib (NIL) used for treatment of chronic myeloid leukemia and Lapatinib (LAP) that is used against breast cancer, in human plasma. Samples were prepared by simple protein precipitation with methanol containing deuterated internal standards. After centrifugation, supernatant was diluted 10 times with mixture of methanol and water (1:1). All four analytes are measured within wide calibration range (0.05 – 5.0 μg/mL for NIL and IMA, 0.1 – 10.0 μg/mL for LAP and 0.025 – 2.5 μg/mL for DAS) in less than 16 sec. RapidFire ultra-fast autosampler/on-line SPE system was coupled to a QTRAP 5500 triple quadrupole instrument operated in MRM mode. C4 cartridge was used for SPE and elution was done by acetonitrile. RFIntegrator software was used for peak integration and Microsoft Excel for data analysis. All compounds analyzed had both intra- and inter-day accuracies within 15% and coefficient of variation less than 15% for all concentrations within the linear range. Even though the absolute matrix effects were higher in comparison with LC-MS methods, their effect on method performance was eliminated by usage of deuterated internal standards. This system allows throughput of > 200 samples per hour providing comparable results with LC/MS methods [1]. With increasing number of patients receiving TKIs, this method can be advantageously used for high-throughput therapeutic monitoring in clinical research laboratories.

* Korespondence: ivo.vrobel@gmail.com

LITERATURA:

1. Haouala A. et al.: J. Chromatogr. B 877, 1982-1996 (2009).

PODĚKOVÁNÍ:

Grants NT12218, CZ.1.05/2.1.00/01.0030, post doc grant CZ.1.07/2.3.00/30.0004, CZ.1.07/2.3.00/20.0170, Czech Science Foundation Grant I 1910-N26 are acknowledged.

WeP-035: Reactions of ions with electrons and molecules at low temperatures

Petr Dohnal [1 *], Štěpán Roučka [1], Dmytro Mulin [1], Serhiy Rednyk [1], Artem Kovalenko [1], Abel Kalosi [1], Radek Plašil [1], Juraj Glosík [1]

1. Charles University in Prague, Faculty of Mathematics and Physics, Praha

The reaction rates of small astrophysically relevant ions with electrons and molecules are of principial interest for modeling of chemical reactions in interstellar clouds and for understanding of chemistry in planetary atmospheres.

The results of experimental studies focusing on determination of state specific recombination rate coefficients (recombination of ortho- and para-H3+ with electrons), and on ion-molecule reaction rate determination (e.g. isotopic exchange reactions of OH- + D2 and OD- + H2) will be presented. The applied experimental techniques were: Cryo-FALP II (Cryogenic Flowing Afterglow with Langmuir Probe), SA-CRDS (Stationary Afterglow with Cavity Ring Down Spectrometer) and the cryogenic 22-pole radiofrequency ion trap. The reactions were studied at temperatures as low as 10 K, i.e. at conditions relevant for interstellar matter.

* Korespondence: pr.dohnal@seznam.cz

PODĚKOVÁNÍ:

This work was partly supported by Czech Science Foundation projects GACR P209/12/0233, GACR 14-14649P, GACR 14-14715P and GACR 15-15077S and by Charles University in Prague projects GAUK 659112, GAUK 692214, GAUK 572214, UNCE 204020/2012 and SVV 260 090.

WeP-036: Atypical myopathy - metabolite profiling of equine serum and urine

Radana Karlíková [1,2], Jitka Široká [1], **Jan Václavík** [1,2 *], Františka Hrdinová [3], David Friedecký [1,4], Zuzana Drábková [3], Alžběta Gardlo [1,5], Hana Janečková [4], Petr Jahn [3], Tomáš Adam [4,2]

1. Institute of Molecular and Translational Medicine, UP, Olomouc
2. Department of Clinical Biochemistry, University Hospital, Olomouc
3. University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno
4. Laboratory of Inherited Metabolic Disorders, University Hospital, Olomouc
5. Department of Mathematical analysis and applications of Mathematics, UP, Olomouc

Acquired equine multiple acyl−CoA dehydrogenase deficiency also known as atypical myopathy (AM), is a highly fatal muscle disease of grazing horses. This syndrome is probably caused by ingestion of Acer Pseudoplatanus seeds containing hypoglycin A, whose active metabolite, the methylenecyclopropylacetic acid, is responsible for an inhibition of some dehydrogenases that using FAD as a cofactor (short and medium chain acyl−CoA dehydrogenases, isovaleryl-CoA dehydrogenase etc. [1, 2]). Nine serum and six urine samples from horses with AM and twelve control samples were collected and then analyzed using high performance liquid chromatography (Ultimate 3000, Dionex) with aminopropyl column (Luna 3 μm NH2, 2 x 100 mm, Phenomenex) coupled to tandem mass spectrometry (QTRAP 5500, AB Sciex). The metabolites were detected by multiple reaction monitoring (MRM) in both positive and negative mode. Data were processed by unsupervised (Principal component analysis − PCA) and supervised (Orthogonal partial least squares discriminant analysis − OPLS−DA) multivariate analysis. The results of equine serum and urine show obvious separation of group with AM and control group. The differences were found not only in levels of glycine conjugates (isobutyrylglycine, hexanoylglycine, suberylglycine, phenylpropionylglycine), acylcarnitines (C2 - C20), which well corresponds with previously published results [2, 3], but also in purine metabolites (inosine, hypoxanthine, adenine, adenosine) and some organic and amino acids (aspartate, cysteine, tryptophan, homoarginine, betaine) etc. suggesting that AM affects the other metabolic pathways.

* Korespondence: janvaclavik87@gmail.com

LITERATURA:

1. Votion D.M. et al.: Equine Vet. J. 46(2), 146-149 (2014).
2. Valberg S.J. et al.: Equine Vet. J. 45(4), 419-426 (2013).
3. Westermann C.M. et al.: Neuromuscul. Disord. 18(5), 355-364 (2008).

PODĚKOVÁNÍ:

The work was supported by grants LF UP 2014-011, Czech Science Foundation Grant I 1910-N26, IGA VFU Brno, No. 86/2014/FVL and CZ.1.07/2.3.00/30.0004. The infrastructural part of this project (Institute of Molecular and Translational Medicine) was supported from NPU I (LO1304).

WeP-037: Metabolite profiling of plasma and leukocytes of chronic myeloid leukemia patients

Jitka Široká [1], **Radana Karlíková** [1,2 *], Marcela Hrdá [1], David Friedecký [1,3], Kateřina Mičová [1,2], Edgar Faber [4], Alžběta Gardlo [1,5], Hana Janečková [3], Tomáš Adam [3,2]

1. Institute of Molecular and Translational Medicine, UP, Olomouc, Czech Republic
2. Department of Clinical Biochemistry, University Hospital, Olomouc, Czech Republic
3. Laboratory of Inherited Metabolic Disorders, University Hospital, Olomouc, Czech Republic
4. Hematooncology clinic, University Hospital, Olomouc, Czech Republic
5. Department of Mathematical analysis and applications of Mathematics, UP, Olomouc, Czech Republic

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder caused by constitutively active BCR-ABL tyrosine kinase. The objective of this work was to evaluate the influence of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) approved in the CML treatment to the overall plasma and leukocyte metabolite profiles in the patients. Plasma and leukocyte samples were analysed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The data acquisition was proceeded in both positive and negative multiple reaction monitoring mode and the metabolites were detected and quantified. The statistical treatment of the data involved both unsupervised (principal component analysis) and supervised (discriminant function analysis, orthogonal partial least squares discriminant analysis) methods using R programme language with statistics packages. 152 metabolites in leukocytes and 124 metabolites in plasma were detected in 6 groups of samples: healthy controls, newly diagnosed patients, patients treated with Imatinib, Dasatinib, Nilotinib and Hydroxyurea. The unsupervised statistical models show overlap of hydroxyurea treated with newly diagnosed in both plasma and leukocytes samples suggesting similar metabolomic composition. In leukocyte samples TKI treated (except dasatinib) overlap controls whereas cluster far from newly diagnosed, which indicates metabolome regulation towards the normal profile. Although only four dasatinib treated patients leukocytes were processed, dasatinib treated partly overlap TKI treated, but seems to differ from controls. Also in plasma samples the TKI treated overlap controls, but the separation from newly diagnosed is not so clear as in leukocytes. The supervised statistical models show similar characteristics as the unsupervised ones with some trends more obvious.

* Korespondence: radana.karlikova@gmail.com

PODĚKOVÁNÍ:

Acknowledgements: NT12218, CZ.1.05/2.1.00/01.0030, post doc grant CZ. 1.07/2.3.00/30.0004, CZ.1.07/2.3.00/20.0170, Czech Science Foundation Grant I 1910-N26.

WeP-038: Měření kinetiky reakčních intermediátů pomocí hmotnostní spektrometrie

Lucie Jašíková [1 *], Jana Roithová [1]

1. Katedra organické chemie, Karlova Univerzita v Praze

Hmotnostní spektrometrie spojená s elektrosprejovou ionizací (ESI-MS) nám dává možnost přímo sledovat změny v reakčním roztoku a díky tomu představuje důležitý článek ve studiu reakčních mechanismů. Nespornou výhodou ESI-MS je její citlivost. Reakční intermediáty, které jsou často přítomny v roztoku jen ve velmi malé koncentraci, mohou být izolovány v plynné fázi a jejich reaktivita může být dále studována.

My jsme vyvinuli novou metodu pro studium reakčních intermediátů pomocí ESI-MS.[1] Tato metoda je založena na sledování reakční směsi, která obsahuje izotopicky značený a neznačený reaktant. Jeden z reaktantů např. značený je přidán k reakční směsi s časovým zpožděním. Tento trik nám dovoluje zjišťovat, zda sledovaný ion v plynné fázi představuje reakční intermediát v kapalné fázi nebo zda se jedná pouze o artefakt z procesu tvorby iontů v elektrospreji. Navíc můžeme určit poločas života jednotlivých intermediátů.

Pomocí této metody jsme studovali reakční mechanismus zlatem katalyzované adice methanolu na alkyn. Porovnávali jsme dva různé typy zlatých katalyzátorů (zlato s fosfinovým nebo karbenovým ligandem), dále jsme studovali vliv přídavku kyseliny nebo stříbrné soli, která se v zlatné katalýze používá jako pomocný katalyzátor, na rychlost reakce. Pro srovnání jsme také reakci studovali pomocí NMR spektroskopie.

* Korespondence: lucie.jasikova@centrum.cz

LITERATURA:

1. Roithová J. et al.: Angew. Chem. Int. Ed. 51, 8378 (2012).

WeP-039: Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in clinical practice for analysis of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine

Barbora Červinková [1,2 *], Lenka Kujovská Krčmová [1,2], Dagmar Solichová [2], Petr Solich [1]

1. Department of Analytical Chemistry, Charles University in Prague Faculty of Pharmacy, Hradec Králové
2. 3rd Internal Gerontometabolic Clinic, University Hospital, Hradec Králové

Living organisms are constantly attacked by reactive oxygen and nitrogen species. If there is an imbalance between concentration of antioxidants and reactive radicals, oxidation of essential parts of cells may occur. Oxidative damage of DNA may results in the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OH2dG). It was reported that significantly increased levels of 8OH2dG are connected with serious diseases including numerous types of malignancies such as acute leukaemia, hepatocellular, colorectal, breast and lung cancers [1, 2].

The novel method for the analysis of 8OH2dG and creatinine in human urine was developed. In this work Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) technique coupled with UV and mass spectrometry detection (MS/MS) was used. During the method development various types of modern UHPLC stationary phases, such as Ascentis Express RP Amide, Aquity UPLC BEH Amide, Kinetex HILIC and C18 were tested. Columns with different dimension, particle size (2.7 μm, 1.7 μm) and character (porous-shell, full porous) were compared. Best results were achieved, when Aquity UPLC BEH Amide column working in HILIC mode was used. This stationary phase proved to be suitable for the determination of small and polar molecule, such as 8OH2dG and also for creatinine. All analyses were performed on UHPLC system Nexera with Mass spectrometry detector LC-MS 8030 (Shimadzu, Japan). As a sample preparation procedure solid phase extraction was selected.

This newly developed chromatographic method will be used for the determination of 8OH2dG and creatinine in urine of patients suffering from cancer. Our results might help to extend the knowledge about the progression of cancer and therapy effect.

* Korespondence: cervb7aa@faf.cuni.cz

LITERATURA:

1. Zhang S-W. et al.: Anal. Bioanal. Chem. 395, 479–487 (2009).
2. Hsu W. et al.: Clin. Chim. Acta 402, 31–37 (2009).

PODĚKOVÁNÍ:

The authors thank for financial support to the project SVV 260 184 and the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic, TEAB, project no. CZ.1.07/2.3.00/20.0235.

WeP-040: Gas-phase study of metals complexes with redox-active ligands by IRMPD-spectroscopy and DFT calculations

Ghazaleh Yassaghi [1], Jana Roithová [1 *]

1. Department of Organic Chemistry, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Nature's use of redox-active moieties combined with 3d transition metal ions is a powerful strategy to promote multi-electron catalytic reactions.[1] Redox-active ligands often facilitate vital multi-electron catalytic transformations. The role of copper ion in biology is noteworthy as it transfers electron at a relatively low potential. It is a part of cytochrome c oxidase, hemocyanin, and other important electron-transfer proteins/redox enzymes.

Here, we have investigated interaction of copper(I) and copper(II) with redox-active ligands such as 9,10-phenanthraquinone, maltol and catechol. We have compared the complexes with complexes of other metals (Zn, Ag and Na), where we do not expect any redox processes. The structure and properties of the complexes are investigated by means of IRMPD spectroscopy and DFT calculations. The idea is to use the C=O carbonyl and C-O stretching mode of these ligands as a diagnostic marker.[2,3]

* Korespondence: jana.roithova@natur.cuni.cz

LITERATURA:

1. Vijayendran K. et al.: Angew. Chem. Int. Ed 51, 10228–10234 (2012).
2. Milko P. et al.: J. Am. Chem. Soc 130, 7186 (2008).
3. Milko P. and Roithová J.: Inorg. Chem 48, 11734 (2009).

PODĚKOVÁNÍ:

This work is supported by GAČR (14-20077S).

WeP-041: Gas phase characterization of reaction intermediates: carboxylate assisted C-H activation

Alexandra Tsybizova [1], Andrew Gray [1], Jana Roithova [1 *]

1. Univerzita Karlova v Praze

C-H bond activation is an important topic for modern organic synthesis. While selective C-H bond activation of pure hydrocarbons is still a challenge,[1,2] there are many approaches that allow the activation of C-H bonds in functionalized molecules. It has been shown that some C-H activation reactions can proceed much more efficiently, if a salt of a carboxylic acid is added to the reaction mixture, or if typical metal acetates are used as catalysts.[3]

In this work we applied electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and collision induced dissociation (CID) to study the model 2-phenylpyridine system with various metal carboxylates (Ru, Pd and Cu). The ESI-MS spectra revealed the formation of ions containing AcO^- ligands that lose acetic acid upon CID. CID experiments have also allowed us to construct Hammett plots that revealed that the use of stronger acids accelerates the C-H activation step.

Potential energy surfaces were calculated for the loss of AcOH and the energy required for these processes was determined. Infrared multiphoton dissociation (IRMPD) spectroscopy was combined with the computational studies to investigate the structures of the observed ions.

* Korespondence: jana.roithova@natur.cuni.cz

LITERATURA:

1. Schwarz H.: Angew. Chem. Int. Ed. 50, 10096 (2011).
2. Roithová J. and Schröder D.: Chem. Rev. 110, 1170 (2010).
3. Ackermann L.: Chem. Rev. 111, 1315 (2011).

WeP-042: Izolace a identifikace hydrofobinu SC3

Miroslava Zelená [1 *], Rudolf Kupčík [2], Lenka Česlová [1], Pavel Řehulka [3], Zuzana Bílková [2]

1. Katedra analytické chemie, FCHT, Univerzita Pardubice
2. Katedra biologických a biochemických věd, FCHT, Univerzita Pardubice
3. Katedra molekulární patologie a biologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany

Hydrofobiny jsou primární metabolity plísní s molekulovou hmotností mezi 7-15 kDa. V primární sekvenci se vyznačují typickým vzorem osmi cysteinů, které jsou propojeny čtyřmi disulfidickými můstky. Charakteristickou vlastností hydrofobinů je povrchová aktivita a schopnost samoshluknutí na různých typech rozhraní, proto je jejich izolace velmi obtížná. V této práci byla pro izolaci hydrofobinu SC3 (Schizophyllum commune) vyvinuta nová metoda, která využívá vysokou hydrofobicitu těchto proteinů a silnou afinitu k teflonu jako adsorpčnímu činidlu. Pomocí teflonových mikročástic byl selektivně izolován hydrofobin SC3 z modelových směsí proteinů. Tato technika je velmi efektivní, časově nenáročná a představuje velký potenciál pro izolaci hydrofobinů z reálných vzorků. Účinnost izolace hydrofobinů byla ověřena pomocí tricinové SDS-PAGE. Identifikace hydrofobinu SC3 byla provedena pomocí MALDI-MS s využitím dvou typů analyzátorů – analyzátor doby letu (TOF) a orbitální past (Orbitrap). Pro analýzu na MALDI-TOF/TOF hmotnostním spektrometru byl použit intaktní hydrofobin, ale před analýzou na peptidové úrovni pomocí MALDI-Orbitrap (m/z 50 – 4000) bylo nutné protein nejprve enzymaticky naštěpit. Na základě obsahu aminokyselin v primární struktuře analyzovaného proteinu bylo enzymatické štěpení provedeno pomocí chymotrypsinu a thermolysinu. Úspěšnost štěpení je podmíněna efektivní redukcí a alkylací disulfidických můstků, jelikož hydrofobiny jsou jimi vysoce stabilizované. Pro redukci bylo použito redukční činidlo Tris(2-karboxyethyl)fosfinhydrochlorid v kombinaci s hydrochloridem guanidinu nebo deoxycholátem sodným s následnou alkylací pomocí jodoacetamidu. Úspěšnost enzymatického štěpení byla ověřena pomocí tricinové SDS-PAGE. Vzniklé peptidy byly analyzovány pomocí MALDI-MS.

* Korespondence: miroslava.zelena@student.upce.cz

WeP-043: Nukleofilní reakce GR24

Rostislav Halouzka [1 *], Sanja Ćavar Zeljković [1], Binne Zwanenburg [2], Petr Tarkowski [1]

1. CRH pro biotechnologický a zemědělský výzkum,Centrální laboratoře a podpora výzkumu, Olomouc, CZ
2. Institut molekul a materiálů, Přírodovědecká fakulta, Nijmegen, NL

Strigolaktony (SLs) jsou nová skupina významných rostlinných hormonů. Jejich hydrolýzou dochází ke štěpení enol-etherové vazby a uvolnění butenolidu. Jsou navrženy dva mechanismy hydrolýzy SLs. V prvním případě dochází prostřednictvím nukleofilu k adici na enol-etherovou vazbu, která je následována eliminací butenolidového kruhu (mechanismus A) [1]. Druhý mechanismus se liší místem počátečního ataku příchozího nukleofilu, který se váže na karbonylovou skupinu z již eliminovaného butenolidu (mechanismus B) [2]. Současná studie je věnována stabilitě GR24 (syntetický analog SLs) v různých rozpouštědlech a s látkami nukleofilní povahy jako jsou methanol, benzylamin a imidazol. Reakce jsou monitorovány pomocí UV-VIS spektrometrie a LC-MS. Reakce GR24 s příslušnými nukleofily jsou provedeny v suchém rozpouštědle a sledovány každých 30 minut po dobu 24 hodin při vlnové délce 200 až 450 nm. Reakční směsi jsou analyzovány chromatografii na reverzní fázi a následná identifikace stabilních reakčních produktů je provedena pomocí hmotnostní spektrometrie. Tyto experimenty mohou vést k objasnění, jakým mechanismem podléhá hydrolýza SLs.

* Korespondence: Halouzka@seznam.cz

LITERATURA:

1. Mangnus and Zwanenburg: J. Agric. Food Chem. 40, 1066-1070 (1992).
2. Scaffidi et al.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 22, 3743-3746 (2011).

WeP-044: Drift tube studies of hydration of protonated organic molecules

Anatolii Spesyvyi [1,2 *], Patrik Španěl [1]

1. Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i.
2. Univerzita Karlova v Praze, Matematicko-fyzikální fakulta

Selected Ions Flow Tube mass spectrometry (SIFT-MS) is a versatile technique for real-time detection and quantification of volatile compounds in human breath and headspace. With a known rate constant for the ion-molecular reaction between selected ion precursor and sampled neutral molecules it is possible to obtain the compound concentration in media [1]. The main disadvantage of SIFT-MS is presence of overlapping peaks in spectra for the compounds with same molecular weight [2]. In order to remove this limitation the new Selected Ions Flow Drift Tube (SIFDT) instrument was built. The essential distinction of SIFDT is the uniform drift field, which is applied to the flow tube that thus becomes a drift tube.

An example of such mass overlap could be observed in the situation when both ethanol and formic acid are present in the analysed sample. During the residence in flow tube they have the same products for the reaction with H_3O^+ precursor. Our assumption is that it is possible to determine ratio between concentrations of ethanol and formic acid in mixture using differences in kinetic process in the tube for the set of applied voltages. The influence of field is expressed by the reduction of reaction time and product clusters dissociation [3].

This research for ethanol and formic acid model will be the base for the further investigation for other isobaric compounds. The first results of our studies will be presented on the poster.

* Korespondence: spesyvyi@gmail.com

LITERATURA:

1. Smith D. et al.: Int. J. Mass Spectrom. 303, 81–89 (2011).
2. Brůhová Michalčíková R., Španěl P.: Int. J. Mass Spectrom. 368, 15–22 (2014).
3. Hanson D.R. et al.: Int. J. Mass Spectrom. 223–224, 507–518 (2003).

WeP-045: Reduction of Cu(II) in complexes with DMSO under electrospray ionization conditions

Jana Jaklová Dytrtová [1,2 *], Jana Roithová [3], Michal Jakl [4]

1. Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i.
2. Faculty of Physical Education and Sport, Charles University in Prague
3. Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague
4. Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague

The Cu(II) complexation with dimethyl sulphoxide (DMSO) was studied using electrospray ionization (ESI) mass spectrometry. Under ESI conditions the Cu(II) provides redox reactions depending on the type of ligands and coordination numbers (e.g. [1-3]). Our study describes the influence of DMSO ligand on Cu(II) reduction to Cu(I) and impact of temperature to these copper complexes. The experiments were provided using Finnigan LCQ ion-trap mass spectrometer (ThermoFinnigan, USA) fitted with an electrospray ionization source. Spraying was provided from water milieu. Cu(II) was protected against reduction to Cu(I) in complexes containing 4 or 5 DMSO ligands ([Cu(DMSO)4]2+ and ([Cu(DMSO)52+), in contrast to complexes containing 3 or less DMSO ligands ([Cu(DMSO)3]+ and ([Cu(DMSO)2]+), which is typical behaviour of copper complexes upon ESI[1]. The presence of Cl- in complexes ([CuCl(DMSO)3]+ and ([CuCl(DMSO)2]+) has the stabilization effect to Cu(II)[1] even for smaller number of DMSO ligands. The collision induced dissociation of mass selected [CuCl(DMSO)3]+ leads to neutral loss of one DMSO ligand. The increase of temperature caused rapid decay of less stable complexes ([Cu(DMSO)5]2+ and [Cu(DMSO)3]+). The more stable complexes ([Cu(DMSO)4]2+, [Cu(DMSO)2]+ and [CuCl(DMSO)2,3]+) remain in the spectra in spite of the temperature increases. Owing to the temperature increase the reduction of copper(II) to copper(I) was observed. The copper reduction is also observed for the decay of [Cu(DMSO)4]2+ during the collision induced experiments (one of the daughter ions was [Cu(DMSO)2]+), which supports the theory that linearly double coordination of copper supports reduction of Cu(II) to Cu(I).

* Korespondence: dytrtova@uochb.cas.cz

LITERATURA:

1. Tintaru A. et al.: Phys. Org. Chem. 22, 229-233 (2009).
2. Jaklová Dytrtová J. et al.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 25, 1037-1042 (2011).
3. Tsybizova A. et al.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 26, 2287-2294 (2012).

PODĚKOVÁNÍ:

This work was supported by GACR project No. 13-21409P and by the Ministry of Education of the Czech Republic (S grant).

WeP-046: Bioimaging of ferriforms of siderophores in lung tissues by LA-ICP-MS

Tomáš Pluháček [1,2 *], Dominika Luptáková [3,2], Miloš Petřík [4], David Milde [1], Vladimír Havlíček [1,2]

1. Palacký University, Faculty of Science, Department of Analytical chemistry, RCPTM
2. Institute of Microbiology, v.v.i.
3. Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, Slovak Academy of Sciences
4. Palacký University, Faculty of Medicine and Dentistry, IMTM

Invasive pulmonary aspergillosis (IPA) caused by ubiquitous filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* is a fatal lung disease affecting particularly immuno-compromised patients. Its occurrence is more than 200,000 cases worldwide per year, with an associated mortality rate of 30 - 90 % [1]. Iron, considered as an essential nutrient, plays a key role during the virulence of pathogen microorganisms. In order to overcome the restricted bioavailability of free iron in a host organism, the *Aspergillus fumigatus* has evolved sophisticated iron acquisition system based on the biosynthesis and excretion of hydroxamate-type siderophores, which are employed in iron delivery from hem in hemoglobin and other host iron-binding proteins (like transferrin, lactoferrin, ferritin). The unique role of hydroxamate siderophores during pathogen virulence defines their potential application as emerging infection disease biomarkers in IPA context.

In this contribution, the objective is the application of LA-ICP-MS to investigate the lateral distribution of iron bound into siderophore complexes across control and infected lung tissue sections coming from *Aspergillus* infection rat model [2]. Analysis of iron, exactly its ^{56}Fe and ^{57}Fe isotopes, was carried out by the excimer laser ablation system Analyte G2 (Photon Machines, USA) coupled to a quadrupole ICP-MS spectrometer (7700x, Agilent, Japan) equipped with an octopole reaction system working in helium mode to overcome spectral interferences observed mainly on ^{56}Fe . The raw data processing and statistical evaluation of reconstructed iron distribution maps were performed by ImageLab multisensor imaging software and the acquired results were correlated with the corresponding histology.

* Korespondence: pluhacektomas20@seznam.cz

LITERATURA:

1. Thornton C.R.: Expert. Rev. Clin. Immunol. 10, 771-780 (2014).
2. Petrik M. et al.: J. Nucl. Med. 51, 639-645 (2010).

PODĚKOVÁNÍ:

The authors gratefully acknowledge the support from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (LO1305, LD13038).

WeP-047: Kationtové π-komplexy stříbra a zlata s nenasyceními uhlovodíky

Petr Motloch [1 *], Jana Roithová [1]

1. Univerzita Karlova v Praze

Katalýza zlatem(I) je jednou z rychle se rozvíjejících oblastí dnešní homogenní katalýzy. Za první reakční krok je považována koordinace zlatného kationu na nenasycenou C-C vazbu, čímž dochází ke vzniku kationtových π-komplexů.[1] Stříbrné soli jsou ve zlatné katalýze často využívány pro snadnou aktivaci zlatných prekatalyzátorů in situ či přímo před jejich použitím. Recentní práce ukázala, že u některých reakcí tyto stříbrné sloučeniny neplní funkci jen jako aktivátory zlatných prekatalyzátorů, ale že je jejich přítomnost společně se zlatnými sloučeninami nezbytná pro uskutečnění některých reakcí. Autoři dané publikace poukázali na přehlížený „efekt stříbra" v katalýze zlatem.[2] Za cíl této práce jsme si určili zjistit, jestli stříbro nemůže konkurovat zlatu při vzniku výše zmíněných kationtových π-komplexů a tedy měnit mechanismy daných reakcí již v úvodních krocích.

V této práci jsme zkoumali vazebné disociační energie kationtových zlatných a stříbrných π-komplexů s různými uhlovodíky pomocí kolizně indukovaných disociací (CID) v hmotnostním spektrometru. Konkrétně jsme použili různě substituované alkeny, alkyny, alkadieny a alleny. Jako druhý ligand na přechodném kovu jsme využili trifenylfosfín a u stříbra navíc i acetonitril, který simuloval pravděpodobnou solvataci stříbra v roztoku. Studii jsme doplnili dalšími teoretickými výpočty.

* Korespondence: petr.motloch@natur.cuni.cz

LITERATURA:

1. Brooner R.E.M. et al.: Angew. Chem. Int. Ed. 52, 11714 (2013).
2. Wang D. et al.: J. Am. Chem. Soc. 134, 9012 (2012).

PODĚKOVÁNÍ:

Autoři děkují za podporu grantům GAČR 14-20077S a ERC StG ISORI.

WeP-048: Increase of methanol in exhaled breath following aspartame ingestion as quantified by SIFT-MS

Kseniya Dryahina [1 *], Patrik Španěl [1]

1. Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i.

Aspartame, IUPAC ID N-(L-α-Aspartyl)-L-phenylalanine,1-methyl ester, is used worldwide as a sweetener in confectionary and fizzy drinks and is considered to be safe at an acceptable daily intake (ADI) of 40 mg per kg of body weight [1]. This compound metabolises in the upper gastrointestinal tract forming aspartic acid, phenylalanine and methanol, each being toxic at high levels. The objective of the present study was to quantify the volatile methanol component in the exhaled breath of ten healthy volunteers following the ingestion of a single dose of aspartame at the ADI given above. On-line measurements were made in single breath exhalations using selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS [2], several times before aspartame ingestion in order to establish pre-dose (baseline) methanol concentrations and then for about two hours post-ingestion to track the initial increase and subsequent decrease of the breath methanol concentration. The results show that breath methanol increased in all volunteers from their pre-ingestion levels, in the range 193 to 436 parts-per-billion by volume, ppbv, to peak levels within range 981-1622 ppbv, and then slowly decreases. From the known amount of aspartame ingested and the estimated total body water of each volunteer, the predicted increase of breath methanol concentration was seen to be in remarkable agreement with the measured values. The results indicate that the ADI of aspartame leads to a 3 – 6 fold increase of blood and exhaled breath methanol concentration.

* Korespondence: dryahina@jh-inst.cas.cz

LITERATURA:

1. Butchko H.H. et al.: Regul. Toxicol. Pharmacol. 35, S1-S93 (2002).
2. Španěl P. et al.: Int. J. Mass Spectrom. 249, 230-9 (2006).

PODĚKOVÁNÍ:

We thank the Czech Science Foundation (GACR) for their financial support under grant number GACR 14-14534S and 13-28882S.

WeP-049: The role of molecular quadrupole transitions in the depopulation of metastable helium

Lucie Augustovičová [1 *], Wofgang P. Kraemer [2], Vladimír Špirko [3], Pavel Soldán [1]

1. Charles University in Prague, Faculty of Mathematics and Physics
2. Max-Planck-Institute of Astrophysics, Postfach 1371, D-85741 Garching, Germany
3. Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic

Depopulation of metastable He(2^3 S) and He(2^1 S) by radiative association with helium ions resulting in the formation of the He^+ molecular ions is investigated [1]. Rate coefficients for spontaneous radiative association of the He_2^+ molecular ion on the spin-doublet manifold are presented as functions of temperature up to 500 000 K considering the association to rotational-vibrational bound states of the lowest doublet electronic states $X^2\,\Sigma_u^+$ and $A^2\,\Sigma_g^+$ from the continuum states of the excited doublet electronic states $B^2\,\Sigma_u^+$ and $D^2\,\Sigma_u^+$. The dipole-driven processes B → A and D → A are compared to the quadrupole-driven processes B → X and D → X. For all considered temperatures the dipole-driven process D → A dominates over the other processes. The rate coefficient for the quadrupole-driven process B → X is at least three orders of magnitude larger than the rate coefficient of the dipole-driven process B → A.

* Korespondence: santpaulia@seznam.cz

LITERATURA:

1. Augustovičová L. et al.: Mon. Not. R. Astron. Soc. 446, 2738 (2015).

PODĚKOVÁNÍ:

LA acknowledges funding from the Grant Agency of the Charles University in Prague GAUK (Grant no. 550112). LA and VS also appreciate support of the Czech Science Foundation - GACR (Grant no. P208/11/0436).

WeP-050: Analýza aromaprofilu bylinných čajů metodou HS-SPME/GC-MS s využitím více sorpčních teplot v jednom extrakčním kroku

Petra Šilarová [1 *], Martin Adam [1]

1. Univerzita Pardubice

Silice jsou známé svými účinky na lidský organismus. Lidé využívali mnoho druhů bylin a koření k léčení různých nemocí (např. levandule má protizánětlivý a analgetický účinek, meduňka proti kašli, pelyněk pro zažívání, atd.). Složky rostlinných silic příznivě působí na nervový a imunitní systém. Silice obsažené v bylinných nápojích se díky své těkavosti většinou stanovují pomocí plynové chromatografie. Před chromatografickou separací složek silic se často zařazuje vhodná metoda pro jejich zakoncentrování. V této práci byla k zakoncentrování využita mikroextrakce tuhou fází z „headspace" prostoru (HS-SPME) a následně byly analyty desorbovány a analyzovány s využitím spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS). Pro analýzu 10 druhů směsných bylinných čajů bylo zvoleno vlákno 50/30 μm DVB/CAR/PDMS. Dle principů plánování experimentu byla optimalizována teplota a doba extrakce a také vliv NaCl. Na základě statistického vyhodnocení odezvové plochy byly zvoleny optimální podmínky extrakce: teplota 80 °C, doba extrakce 40 minut a bez přídavku NaCl. Dále byly optimalizovány podmínky pro vzorkování HS-SPME s využitím dvou sorpčních teplot. Na základě vyhodnocení celkových ploch píků a celkového počtu píků byla pro analýzu silic kromě 80 °C využita i teplota 40 °C, při které dochází ke zvýšení extrakční účinnosti těkavějších složek, u kterých se při 80 °C již významným způsobem projevuje vliv desorpce z vlákna. Za těchto podmínek lze extrahovat méně těkavé i více těkavé látky v jednom kroku.

* Korespondence: st26939@student.upce.cz

WeP-051: SIFT-MS for real-time quantification of volatile oxidative stress markers in cancer cells

Violetta Shestivska [1], Kseniya Dryahina [1], Stefan S Antonowicz [2], Jiří Kubišta [1], David Smith [3], Patrik Španěl [1 *]

1. Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i.
2. Department of Surgery and Cancer, Imperial College London, St. Mary's Hospital, London
3. Institute for Science and Technology in Medicine, School of Medicine, Keele University, Thornburrow

Real time analysis of trace amounts of volatile organic compounds is becoming an active research field with the advent of mass spectrometry methods including Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry (SIFT-MS) [1]. Such immediate and quantitative analyses offer possibilities in areas of clinical diagnostics of lung infection or lung cancer monitoring [2] on the basis of measurements of concentrations of volatile biomarkers.

It is known that cancer invasion and other infection cause conformal changes and necrosis of cells. This is driving processes like peroxide oxidation of cell membrane lipids, which may cause releasing different volatile compounds. The end products of lipid peroxidation are reactive aldehydes, such as malondialdehyde (MDA) [3]. The direct quantification of MDA molecules in the gas phase has not been achieved yet, but should this be possible, it could be a valuable target compound and a non-invasive biomarker by headspace studies of biogenic liquid fluids and in breath analysis for bacterial lung infection or lung cancer. The SIFT-MS technique has been used to determine the rate coefficients with gas phase MDA. The primary product ions have been identified for the reactions of H_3O^+, NO^+ and $O_2^{+\bullet}$.Then, in support of SIFT-MS analysis of MDA, solid phase microextraction (SPME), coupled with gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) has been used to confirm MDA identification.

This detailed study has provided the kinetics data required for the SIFT-MS analysis of MDA in humid air, including exhaled breath and the headspace of liquid phase biogenic media. Consequently, the quantification of MDA in humid gaseous media can now be used to assess oxidative stress in biogenic systems.

* Korespondence: shestivsk@seznam.cz

LITERATURA:

1. Španěl P. and Smith D.: Mass Spectrom. Rev. 30(2), 236-267 (2011).
2. Amann A. et al.: Expert Rev. Mol. Diagn. 11(2), 207-217 (2011).
3. Valko M. et al.: Chem. Biol. Interact 160(1), 1-40 (2006).

PODĚKOVÁNÍ:

We gratefully acknowledge funding from Grant Agency of the Czech Republic project No 14-15771P. We also thank to Dr. Marek Cebecauer for assistance with the cell cultures.

WeP-052: Determination of vitamin D metabolites using UHPLC-MS/MS

Lenka Kujovská Krčmová [1,2 *], Jiří Plíšek [1,2], Eva Kasalová [1,2], Barbora Červinková [1,2], Dagmar Solichová [2], Petr Solich [1]

1. Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University
2. 3rd Internal Gerontometabolic Clinic, University Hospital Hradec Králové

Current clinical research is based on the determination of biologically active compounds which could help to monitor progression of serious diseases and also effectiveness of the treatment.The requirements for biomedical analyses are continuously increasing, therefore the timesaving and effective methods are used more often.

Biomarkers, 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2, are important indicators of the vitamin D general status and are monitored in several pathophysiological disorders, such as osteoporosis, diabetes, heart disease, etc. A novel UHPLC-MS/MS metod for the analysis of 25-hydroxyvitamin D derivatives coupled with a very simple and highly rapid sample preparation step was developed. Obtained analytical parameters showed linearity (R2) above 0.999 for both vitamins with accuracies between 95.8 and 102%. The LODs were as low as 0.22 and 0.67 nmol/L for 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2, respectively. Intra-assay precision (%RSD) was lower than 4.5%, and inter-assay precision (%RSD) was lower than 6.5%.

The very fast sample preparation consisted of simple precipitation and filtration steps using microtiter plates, which allowed handling 96 samples in one operation; therefore, it is suitable for the routine analysis of high number of samples. The newly developed method was applied for the real analysis of 25-OH D3 and 25-OH D2 in human serum in various groups of patients and can be used in clinical research and also in routine practice.

* Korespondence: lenka.krcmova@faf.cuni.cz

PODĚKOVÁNÍ:

The work is co-financed by the project IGA MH CR NT 14265-3/2013, NT/13564-4, NT/13566-4 and project SVV 260 184, the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic, TEAB, project no. CZ.1.07/2.3.00/20.0235.

Adam Martin WeP-050
Adam Tomáš WeP-032
Adam Tomáš WeP-033
Adam Tomáš WeP-034
Adam Tomáš WeP-036
Adam Tomáš WeP-037
Antonowicz Stefan S WeP-051
Armentrout Peter B. WeO-001
Augustovičová Lucie WeP-049
Bednařík Antonín ThO-011
Bednařík Antonín WeP-029
Belza Jan WeP-010
Benada Oldrich WeP-013
Benešová I.....WeP-018
Benešová Iva WeP-012
Benešová Iva WeP-014
Benett Aneta WeP-002
Benická Sandra WeP-027
Bílková Zuzana WeP-002
Bílková Zuzana WeP-042
Borovcová Lucie.....WeP-027
Brabcová Ivana FrO-018
Cajthaml Tomáš WeP-021
Cajthaml Tomáš WeP-030
Cajthaml Tomáš WeP-031
Ćavar Zeljković Sanja.....WeP-043
Coufalová Dominika WeP-019
Coufalová Eva WeP-002
Cvačka Josef ThO-010
Cvačka Josef WeP-025
Cvačka Josef WeP-028
Černá Martina FrO-018
Černá Věra WeP-006
Černý Jan WeP-004
Červinková Barbora.....WeP-039
Červinková Barbora.....WeP-052
Česlová Lenka WeP-042
Čvančarová Monika.....WeP-021
Čvančarová Monika.....WeP-030
Danchenko Maksym WeP-001
Darebná Petra.....FrO-019
Dlabková Kristýna WeP-012
Dlabková Kristýna WeP-014
Dohnal Petr WeP-035
Doktorová Eliška ThO-005
Drábková Zuzana.....WeP-036
Dračínská Helena.....WeP-006
Dryahina Kseniya.....WeO-003
Dryahina Kseniya WeP-015
Dryahina Kseniya WeP-048
Dryahina Kseniya WeP-051
Dvorak Vit WeP-007
Eckhardt Adam WeP-023
Eyer K. WeP-018
Faber Edgar.....WeP-033
Faber Edgar.....WeP-034
Faber Edgar.....WeP-037
Fabrik Ivo WeP-008
Fagerer S. R. WeP-018
Fárník Michal WeO-002
Flores Ramirez Gabriela WeP-001
Friedecký David WeP-032
Friedecký David WeP-033
Friedecký David WeP-034
Friedecký David WeP-036
Friedecký David WeP-037
Fryčák Petr.....ThO-015
Fryčák Petr.....WeP-026
Gardlo Alžběta.....WeP-036
Gardlo Alžběta.....WeP-037
Gerlich Dieter WeP-017
Glosík Juraj.....WeP-035
Goldman Radoslav FrO-019
Gray Andrew.....WeP-041
Grobárová Valéria.....WeP-004
Háková Eva.....ThO-010
Háková Eva.....WeP-028
Halada Petr.....WeP-007
Halada Petr.....WeP-009
Halada Petr.....WeP-020
Halada Petr.....WeP-031
Halouzka Rostislav WeP-043
Hanzlová Eva WeO-004
Harant Karel ThO-008
Hartmanová Lucie WeP-026
Hausner Jiří.....WeP-005
Havlicek Vladimir WeP-013
Havlíček Vladimír.....ThO-007
Havlíček Vladimír.....ThO-014
Havlíček Vladimír WeP-026
Havlíček Vladimír WeP-027
Havlíček Vladimír WeP-046
Hernychova Lenka.....WeP-001
Hernychová Lenka.....WeP-011
Hernychová Lenka.....WeP-019
Hernychová Lucie WeP-004
Hlavackova Kristyna WeP-007
Hoskovec Michal ThO-010
Hrdá Marcela WeP-033
Hrdá Marcela WeP-037

Hrdinová Františka WeP-036
Hubálek Martin WeP-010
Hynek Radovan ThO-014
Chmelíčková Hana.....WeP-026
Chmelík Josef WeP-016
Ingr Tomáš WeP-026
Ivanova Ljubina WeP-020
Jacobsen M. WeP-018
Jägerová Kateřina WeP-014
Jágr Michal WeP-023
Jahn Petr.....WeP-036
Jakl Michal WeP-045
Jaklová Dytrtová Jana.....WeP-045
Janečková Hana WeP-036
Janečková Hana WeP-037
Jankovičová Barbora WeP-002
Janovská Petra FrO-018
Jašík Juraj WeP-017
Jašíková Lucie WeP-038
Ječmen Tomáš.....WeP-003
Ječmen Tomáš.....WeP-006
Kádek Alan ThO-005
Kádek Alan WeP-009
Kádek Alan WeP-020
Kalosi Abel WeP-035
Kanický Viktor WeP-012
Kanický Viktor WeP-014
Kanický Viktor WeP-029
Karlíková Radana WeP-036
Karlíková Radana WeP-037
Kasalová Eva WeP-052
Kavan Daniel WeP-004
Kavan Daniel WeP-005
Kavan Daniel WeP-007
Kavan Daniel WeP-009
Kavan Daniel WeP-016
Kavan Daniel WeP-024
Konvalinka Jan WeP-010
Kopecký Jan FrO-018
Kotíková Zora.....WeP-022
Kovalenko Artem.....WeP-035
Kraemer Wofgang P. WeP-049
Krasny Lukas WeP-013
Krásný Lukáš ThO-014
Krismer J.....WeP-018
Křesinová Zdena.....WeP-021
Křesinová Zdena.....WeP-030
Křesinová Zdena.....WeP-031
Kuba Pavel ThO-011
Kubišta Jiří.....WeP-051
Kučera Radek FrO-019
Kuda Ondřej FrO-018
Kujovská Krčmová Lenka WeP-039
Kujovská Krčmová Lenka WeP-052
Kukačka Zdeněk WeP-004
Kukačka Zdeněk WeP-016
Kukačka Zdeněk WeP-024
Kulhavá Lucie.....WeP-023
Kupčík Rudolf WeP-002
Kupčík Rudolf WeP-042
Lemr Karel.....WeP-013
Lemr Karel.....WeP-026
Lemr Karel.....WeP-027
Lengyel Jozef WeO-002
Linhartová Lucie.....WeP-031
Link Marek WeP-008
Link Marek WeP-011
Lorencová Iveta WeP-026
Ludwig Roland WeP-009
Luptáková Dominika WeP-046
Mádrová Lucie.....WeP-032
Maduke Merritt WeP-005
Man Petr.....ThO-005
Man Petr.....WeP-005
Man Petr.....WeP-009
Man Petr.....WeP-020
Man Petr.....WeP-024
Martinů Tomáš.....WeO-004
Med Jakub WeO-002
Mičová Kateřina WeP-032
Mičová Kateřina WeP-033
Mičová Kateřina WeP-034
Mičová Kateřina WeP-037
Míková Radka.....ThO-010
Míková Radka.....WeP-028
Mikšík Ivan.....WeP-023
Milde David WeP-046
Mistrik Robert ThO-009
Moos Martin ThO-013
Moskovets Eugene ThO-011
Motloch Petr WeP-047
Mrázek Hynek WeP-004
Mrázek Hynek WeP-020
Mulin Dmytro WeP-035
Munzarová Lucie WeP-031
Najdekr Lukáš.....WeP-032
Novak Jiri WeP-013
Novák Jiří.....ThO-007
Novák Petr ThO-014
Novák Petr FrO-019

Novák Petr WeP-003
Novák Petr WeP-004
Novák Petr WeP-005
Novák Petr WeP-016
Novák Petr WeP-020
Novák Petr WeP-024
Novotný Miloš Vlastislav WeP-011
Opekarová Iva.....ThO-013
Osička Radim.....WeP-003
Pabst M. WeP-018
Palyzova Andrea WeP-013
Pásztor Pavel WeP-015
Pataridis Statis.....WeP-023
Pauk Volodymyr.....WeP-027
Petrák Jiří ThO-005
Petrus Kamil ThO-013
Petřík Miloš.....WeP-046
Plašil Radek WeP-035
Plavka Richard ThO-010
Plavka Richard WeP-028
Plíšek JIří WeP-052
Pluhacek Tomas WeP-013
Pluháček Tomáš WeP-046
Pol Jaroslav WeP-013
Polanský Ondřej WeP-014
Pompach Petr ThO-014
Pompach Petr FrO-019
Pompach Petr WeP-006
Pompach Petr WeP-024
Pospíšilová Eliška WeP-016
Preisler J.....WeP-018
Preisler Jan ThO-011
Preisler Jan.....WeP-012
Preisler Jan.....WeP-014
Preisler Jan.....WeP-029
Przybylski Michael PL-1
Ptáčková Renata.....WeP-003
Ptáčková Renata.....WeP-006
Pysanenko Andriy WeO-002
Rednyk Serhiy WeP-035
Rehulka Pavel WeP-008
Rey Martial WeP-020
Roithová Jana WeO-004
Roithová Jana.....ThO-012
Roithová Jana.....WeP-017
Roithová Jana.....WeP-038
Roithová Jana.....WeP-040
Roithova Jana.....WeP-041
Roithová Jana.....WeP-045
Roithová Jana.....WeP-047
Roučka Štěpán WeP-035
Ryska Miroslav FrO-016
Řehulka Pavel WeP-011
Řehulka Pavel WeP-042
Scigelová Michaela.....ThO-005
Semerád Jaroslav WeP-021
Shestivska Violetta.....WeP-051
Shcherbachenko Elena ThO-012
Schmidt G. WeP-018
Schriemer David C.....WeP-020
Schug Kevin A.....PL-2
Schulz Jiří ThO-012
Slavíček Petr WeO-002
Smith David WeP-051
Soldán Pavel WeP-049
Solich Petr WeP-039
Solich Petr WeP-052
Solichová Dagmar WeP-039
Solichová Dagmar WeP-052
Spáčil Zdeněk FrO-017
Spesyvyi Anatolii WeP-044
Staněk Václav WeP-002
Strnadová Marcela ThO-014
Strohalm Martin.....WeP-013
Stulik Jiri WeP-008
Svoboda Michal WeP-010
Šanda Miloslav FrO-019
Šašková Klára WeP-010
Šebesta Ondřej WeP-004
Šedo Ondrej ThO-006
Šilarová Petra.....WeP-050
Šimek Petr.....ThO-013
Široká Jitka WeP-032
Široká Jitka WeP-034
Široká Jitka WeP-036
Široká Jitka WeP-037
Škultéty Ľudovít WeP-001
Šmídová Daniela WeO-002
Španěl Patrik WeO-003
Španěl Patrik WeP-015
Španěl Patrik WeP-044
Španěl Patrik WeP-048
Španěl Patrik WeP-051
Špirko Vladimír WeP-049
Šrédlová Kamila WeP-030
Šubčíková Lenka ThO-010
Šulc Miloslav WeP-022
Šulc Miloslav WeP-025
Šulc Miroslav.....WeP-003
Šulc Miroslav.....WeP-006

Tarkowski Petr WeP-043
Topolčan Ondřej FrO-019
Tsybizova Alexandra WeP-041
Václavík Jan WeP-036
Vaculovič Tomáš.....WeP-012
Vališ Karel ThO-014
Váňa Jiří WeO-004
Vít Ondřej ThO-005
Vojtěšek Bořivoj WeP-011
Vojtěšek Bořivoj WeP-019
Volf Petr WeP-007
Volný Michael ThO-014
Volny Michael WeP-013
Vrkoslav Vladimír.....ThO-010
Vrkoslav Vladimír WeP-025
Vrkoslav Vladimír WeP-028
Vrobel Ivo WeP-034
Wahl F. WeP-018
Woffendin Gary ThO-005
Yassaghi Ghazaleh.....WeP-040
Zahradníčková Helena ThO-013
Zahradníková Martina WeP-011
Zdráhal Zbyněk.....ThO-006
Zelená Miroslava WeP-042
Zenobi R. WeP-018
Zwanenburg Binne.....WeP-043

SHIMADZU
Excellence in Science

Detekujte více. Objevujte více.

Shimadzu představuje nové LCMS-8050. Mimořádná citlivost v nejrychlejším hmotnostním spektrometru s trojitým kvadrupólem na světě.

Nový Shimadzu LCMS-8050 hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem přináší ohromující citlivost a mimořádně vysokou rychlost sběru dat tak, aby Vám poskytl přesnou kvantifikaci pro ty nejnáročnější aplikace, jako jsou klinický výzkum, životní prostředí, bezpečnost potravin, studie typu DMPK a ADMET a kvantitativní proteomiky.

Navržen s pokročilými „Ultra-Fast" technologiemi, LCMS-8050 vytváří nové možnosti pro dosažení nízkých limitů kvantifikace ve spojení s nejrychlejším trojitým kvadrupólem na světě, který má skenující rychlost 30.000 u/sec a přepínání polarity 5 msec, čímž pomáhá zvýšit kvalitu dat a průchodnost analýz – a to všechno se špičkovou spolehlivostí.

Nové Shimadzu LCMS-8050 **Rychlost a citlivost, které nemají srovnání.**

www.shimadzu.cz

TRIPLETOF® 6600 SYSTEM WITH **SWATH™ ACQUISITION 2.0**

See more, much more clearly

NEXT-GENERATION PROTEOMICS PLATFORM

SCIEX

http://sciex.com/solutions/life-science-research/proteomics/next-generation-proteomics

http://sciex.com/solutions/life-science-research/swath-acquisition

http://sciex.com/solutions/life-science-research/multi-omics-bioinformatics

Thermo
SCIENTIFIC

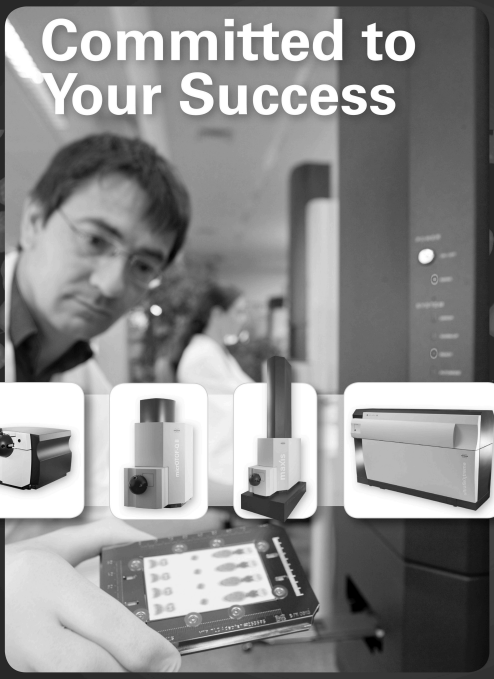
PlanetOrbitrap.com
...Next generation website

- Application Workflows
- Searchable Science Library
- Technology & Products
- Community
- News & Events

Slunečná 27 | 100 00 Praha 10 | 274 820 377 | analyze.cz@thermofisher.com | www.spectronex.cz | planetorbitrap.com

BRUKER

Committed to Your Success



Advanced Mass Spectrometry Solutions

- Ion Trap: amaZon series
- ESI-(Q)-TOF: micrOTOF series
- UHR-TOF: maXis, impact HD, compact
- MALDI-TOF(/TOF): flex series
- FTMS: solariX series
- ESI-QQQ: EVOQ series

For research use only.
Not for use in diagnostic procedures.

Contact us for more details and a system demonstration! www.bruker.com/ms

Proteomics
- Top-down and Bottom-up Strategies
- Flexible Quantitation
- Detailed Intact Protein and PTM Analysis
- Characterization of N-Glycopeptides
- Rapid Characterization of BioPharma Products

Biomarker Analysis
- Full MALDI Imaging Solution
- Profiling via LC-MALDI and LC/ESI-MS
- MALDI Biotyper Bacterial ID

Small Molecules/Metabolites
- Fastest Parallel Multitarget Screening
- Forensic Toxicology
- Pesticide and Food Analysis
- Metabolomics Analysis
- Volatiles Analysis with GC-APCI

Target Screening
- LC/MS Based Metabolic Profiling
- Complementary NMR Workflows
- Empirical Formula Determination
- Full Open Access Capability

Contact
Bruker s.r.o.
Pražákova 100/60, 619 00 Brno

tel.: +420 544 526 988
fax: +420 544 526 989
e-mail: obchod@bdal.cz
web: www.bruker-sro.cz

Innovation with Integrity

Mass Spectrometry